



**Desenvolvimento de Novos Potenciais Inibidores de
Glicosiltransferases como uma Estratégia Terapêutica
Promissora para o Cancro**

Vítor José Inácio Martins

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Doutor Nuno M. Xavier (DQB-FCUL)
Professora Doutora Paula A. Videira (FCT-UNL)

“Aquele que tem uma razão para viver pode suportar quase tudo” – Friedrich Nietzsche

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer ao meu orientador, o Doutor Nuno Manuel Xavier, pelo apoio que me deu ao longo de todo o ano, tendo tido o cuidado de acompanhar todos os passos do caminho, apontando sempre maneiras de melhorar certos aspetos do trabalho. Agradeço ainda à minha co-orientadora, a Professora Doutora Paula A. Videira, por me ter acolhido e apoiado de forma muito calorosa, fazendo com que não me sentisse à nora num novo ambiente quase desconhecido, conferindo-me uma nova forma de olhar a intersecção entre a Química e a Biologia.

Em segundo lugar, queria agradecer à minha família por me terem apoiado ao longo de todo o ano, tanto emocionalmente como monetariamente. Sem eles a realização desta dissertação não seria possível.

Em terceiro lugar, queria agradecer aos meus colegas do Grupo da Química dos Glúcidos, nomeadamente à Andreia Fortuna, por me continuar a aturar todos os dias, sejam eles bons ou maus, e não se ter fartado de mim, já depois de 3 anos de conversas, por vezes, interessantes e sérias, mas na maioria das vezes, hilariantes e sem sentido. Destaca-se também a Maria Teresa “Maite” Blázquez-Sanchez, por toda a ajuda que deu ao longo de todo o ano, tornando impossibilidades em possibilidades. Agradeço igualmente à Ana Marta de Matos e ao Rafael Nunes, pela motivação nos momentos difíceis, bem como à Ana Baptista, ao Bernardo Henriques, ao Eduardo Sousa e ao Euclides Pretti por toda a companhia dentro e fora do laboratório, tornando dias menos bons em dias bons.

Em quarto lugar, queria agradecer aos meus colegas do Grupo de Glicoimunologia da FCT-UNL, em especial, à Doutora Zélia Silva, pela ajuda incalculável ao longo de toda a minha estada no laboratório, sendo parte inalienável do trabalho realizado no laboratório. Agradeço também ao Tiago Costa, por me ter fornecido as células com que pude realizar os testes *in vitro* e me ter ajudado a entender os básicos de cultura celular, Roberta Zoppi, por me ter ajudado a consolidar os meus dotes de pipetagem e de contagem de células, e à Érica Freitas por toda a companhia dentro do laboratório.

Por fim, queria agradecer aos restantes colegas e amigos que fiz ao longo dos últimos 5 anos na FCUL, em especial à Sofia Serra, madrinha de todas as horas e confidente de muitos momentos bons e maus, ao Gabriel Martins e Mónica Antunes, por serem dois grandes amigos que fiz ao longo destes 5 anos na FCUL, e à Catarina Bravo pelo apoio que deu ao longo do ano, por mais difícil que lhe fosse possível de o fazer.

Resumo

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais prevalente nas proteínas e outras biomoléculas, sendo crucial no correto funcionamento de muitos processos fisiopatológicos, tais como a adesão celular, ativação de recetores, resposta imunológica.¹⁻⁷ As glicosiltransferases são as enzimas responsáveis pela glicosilação de mono-, oligo- e polissacáridos, proteínas ou lípidos, formando glicanos e outros glicoconjugados. No cancro, mudanças nos padrões de glicosilação são prevalentes nos seus vários estágios, sendo que este fenómeno é considerado uma das características do cancro.⁵ Logo a inibição de certas glicosiltransferases é uma estratégia promissora na terapia contra o cancro.⁸

No âmbito desta Dissertação foram sintetizados quatro compostos análogos de açúcares de nucleósido difosfato, substratos naturais das glicosiltransferases, contendo grupos (triazolil)metilamida como miméticos mais estáveis, tanto hidroliticamente como enzimaticamente, e neutros do grupo difosfato. Estes compostos contêm variações na unidade glicosídica do fragmento nucleósido, existindo nucleósidos de piranose e furanose, e na regioquímica da ligação N-glicosídica, existindo nucleósidos com ligações N₇ e N₉.⁹ Os compostos foram obtidos com rendimentos que variam entre 25% e 73%.

Estes compostos foram depois estudados quanto à sua solubilidade em meio biológico, verificando-se uma boa solubilidade quando co-solubilizados em DMEM contendo até 0,5% de DMSO. Estudos preliminares relativos à sua ação citotóxica sobre células da linha MDA-MB-231 foram também realizados.

A viabilidade celular das células MDA-MB-231 foi testada pelo método de exclusão com azul tripano e por observação fotográfica das células. Após a realização dos testes, verificou-se uma ligeira diminuição na viabilidade celular.

Palavras-chave: Nucleósidos; Hidratos de Carbono; Síntese; Glicosiltransferases; Cancro

Abstract

Glycosylation is the most common post-translational modification present in proteins and other biomolecules, playing a crucial role in the regulation of many physiopathological processes, such as cell-cell adhesion, receptor activation and immune response.¹⁻⁷ Glycosyltransferases are the enzymes responsible for glycosylation of mono-, oligo- and polysaccharides, proteins or lipids, leading to the formation of glycans and other glycoconjugates. In cancer, changes in glycosylation patterns are ubiquitous in its stages, which can be considered as one of its hallmarks.⁵ Therefore, inhibition of certain glycosyltransferases is a promising therapeutic strategy in cancer therapy.⁸

In this Dissertation, four sugar diphosphate nucleoside analogues, natural substrates for glycosyltransferases, were synthesised, containing a (triazolyl)methylamide moiety as a more enzymatic/hydrolytic stable and neutral bioisostere of the diphosphate moiety. These compounds have variations on the glycosyl unit of the nucleoside fragment, containing either a pyranose or a furanose ring, and on the regiochemistry of the N-glycosidic bond, forming both N₇ and N₉ nucleosides.⁹ The compounds were synthesised in yields ranging from 25% to 73%.

These four compounds were further evaluated for their solubility in biological media and showed good solubility when co-solubilized in DMEM containing up to 0,5% of DMSO. Preliminary studies on their cytotoxic activity in MDA-MB-231 breast cancer cells were also performed.

Cell viability assays were conducted using two methods: Trypan blue exclusion and by photographic cell observation. After testing, these molecules showed a slight decrease in cell viability.

Keywords: Nucleosides; Carbohydrates; Synthesis; Glycosyltransferases; Cancer

O trabalho realizado ao longo desta dissertação foi apresentado nas seguintes comunicações:

- **Poster:**

- “Synthesis of (Triazolyl)methyl Amide-linked Pseudodisaccharide Nucleosides as Potential Inhibitors of Glycosyltransferases”, Vítor J. Martins*, Nuno M. Xavier, *6th Portuguese Young Chemists Meeting*, Setúbal, maio 2018.
- “Synthesis and Biological Evaluation of Novel (Triazolyl)Methyl Amide-linked Pseudodisaccharide Nucleosides as Potential Glycosyltransferase Inhibitors”, Vítor J. Martins*, Paula A. Videira, Nuno M. Xavier, *29th International Carbohydrate Symposium*, Universidade de Lisboa, julho 2018.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract	V
Índice de Figuras.....	XV
Índice de Esquemas.....	XIX
Índice de Tabelas	XXI
Lista de Abreviaturas	XXIII
Simbologia Usada em Glicobiologia (adaptado de ¹⁰)	XXV
Lista de Compostos Sintetizados	XXVII
Capítulo 1 – Introdução.....	1
1.1 O que é a Glicosilação?.....	1
1.1.1 O que são Glicosiltransferases?	1
1.1.1.1 Glicosiltransferases Inversoras.....	3
1.1.1.2 Glicosiltransferases Retentoras	4
1.1.1.3 Especificidade Enzima-Substrato.....	6
1.2 Tipos de Glicosilação.....	7
1.3 Glicosilação no Cancro	7
1.3.1 Tipos de Alterações na Glicosilação	8
1.4 Nucleótidos como Inibidores de Glicosiltransferases	8
1.4.1 O que são Nucleósidos/Nucleótidos.....	8
1.4.2 Importância dos Nucleósidos e Nucleótidos em Química Medicinal	9
1.4.3 Açúcares de Nucleósido Difosfato.....	10
1.4.3.1 Análogos Conhecidos.....	10
Capítulo 2 – Apresentação e Discussão de Resultados	13
2.1 Descrição Geral da Síntese.....	13
2.2 Síntese dos Precursores de Nucleósido (1) a (4), e do 6-Azido Glucósido de Metilo (5). 13	
2.2.1 Síntese dos Precursores de Nucleósido (1-4)	14
2.2.1.1 Síntese dos Precursores de Piranosilo (1) e (2)	14
2.2.1.2 Síntese dos Precursores de Furanosilo (3) e (4)	18
2.2.2 Síntese do Precursor 6-Azido Glucósido de Metilo (5)	20
2.3 Acoplamento dos Precursores (1) a (4) ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	23
2.3.1 Acoplamento do Composto 1 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	23
2.3.1.1 Análise do Espectro de ¹ H- e ¹³ C-RMN do Composto 6	24
2.3.2 Acoplamento do Composto 2 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	24

2.3.2.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto 7	25
2.3.3 Acoplamento do Composto 3 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	25
2.3.3.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto 8	26
2.3.4 Acoplamento do Composto 4 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	26
2.3.4.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto 9	27
2.4 Ensaios de Solubilidade com o Composto 6	29
2.5 Ensaios de Viabilidade Celular com o Composto 7	31
2.5.1 Ensaios Usando o Método de Exclusão com Azul Tripiano	31
2.5.2 Ensaios Realizados com Recurso a Observação Fotográfica das Células.....	34
Capítulo 3 – Experimental	43
3.1 Instrumentação	43
3.2 Técnicas de Separação e Purificação	43
3.3 Síntese dos Precursores de Piranosilo (1), (2).....	45
3.3.1 Abertura da γ -Glucofuranurolactona com Propargilamina	45
3.3.1.1 Procedimento.....	45
3.3.1.2 Caracterização	45
3.3.2 Remoção do Grupo Di- <i>O</i> -Isopropilideno da <i>N</i> -Propargil-Glucofuranuronamida.....	46
3.3.2.1 Procedimento.....	46
3.3.2.2 Caracterização	46
3.3.3 Acetilação da <i>N</i> -Propargil Glucofuranuronamida.....	46
3.3.3.1 Procedimento.....	46
3.3.3.2 Caracterização	47
3.3.4 Acoplamento da 2-Acetamido-6-Cloropurina ao Composto 13	47
3.3.4.1 Procedimento.....	47
3.3.4.2 Caracterização	48
3.4 Síntese dos Precursores de Furanosilo (3), (4).....	50
3.4.1 Abertura da γ -Glucofuranurolactona com Propargilamina	50
3.4.1.1 Procedimento.....	50
3.4.1.2 Caracterização	50
3.4.2 Acetilação da <i>N</i> -Propargil Glucofuranuronamida.....	50
3.4.2.1 Procedimento.....	50
3.4.2.2 Caracterização	50
3.4.3 Remoção do Grupo Di- <i>O</i> -Isopropilideno da <i>N</i> -Propargil-Glucofuranuronamida.....	50
3.4.3.1 Procedimento.....	50
3.4.3.2 Caracterização	50
3.4.4 Acetilação da <i>N</i> -Propargil-3,5-di- <i>O</i> -acetil- α,β -D-glucofuranuronamida.....	51

3.4.4.1 Procedimento.....	51
3.4.4.2 Caracterização	51
3.4.5 Acoplamento da 2-Acetamido-6-Cloropurina ao Composto 16	52
3.4.5.1 Procedimento.....	52
3.4.5.2 Caracterização	52
3.5 Síntese do 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	55
3.5.1 Proteção do Grupo Hidroxilo em C-6	55
3.5.1.1 Procedimento.....	55
3.5.1.2 Caracterização	55
3.5.2 Acetilação do 6- <i>O</i> -Tritil-Glucopiranósido de Metilo.....	55
3.5.2.1 Procedimento.....	55
3.5.2.2 Caracterização	55
3.5.3 Desproteção do Grupo Tritilo em C-6.....	55
3.5.3.1 Procedimento.....	55
3.5.3.2 Caracterização	56
3.5.4 Tosilação do Grupo Hidroxilo em C-6.....	56
3.5.4.1 Procedimento.....	56
3.5.4.2 Caracterização	57
3.5.5 Introdução de um Grupo Azida em C-6	57
3.5.5.1 Procedimento.....	57
3.5.5.2 Caracterização	57
3.6 Acoplamento dos Compostos (1), (2), (3) e (4) ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5)	58
3.6.1 Acoplamento do Composto 1 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	58
3.6.1.1 Procedimento.....	58
3.6.1.2 Caracterização	58
3.6.2 Acoplamento do Composto 2 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	59
3.6.2.1 Procedimento.....	59
3.6.2.2 Caracterização	59
3.6.3 Acoplamento do Composto 3 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	60
3.6.3.1 Procedimento.....	60
3.6.3.2 Caracterização	60
3.6.4 Acoplamento do Composto 4 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5).....	61
3.6.4.1 Procedimento.....	61
3.6.4.2 Caracterização	61
3.7 Manutenção da Cultura Celular	62
3.7.1 Introdução à Linha Celular MDA-MB-231	62

3.7.2 Procedimentos e Manutenção da Cultura Celular	62
3.8 Ensaio de Solubilidade do Composto 6	63
3.8.1 Estratégia de Solubilização do Composto 6	63
3.9 Ensaio de Viabilidade Celular com o Composto 7	64
3.9.1 Método de Exclusão com Azul Tripiano	64
3.9.2 Método de Observação Fotográfica das Células	65
Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras	66
Capítulo 5 – Bibliografia	68
Capítulo 6 – Anexos	72
6.1 Espetros de RMN dos Compostos Sintetizados	72
6.1.1 Espetros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 1	72
6.1.1.1 ¹ H-RMN	72
6.1.1.2 ¹³ C-RMN	73
6.1.1.3 COSY	74
6.1.1.4 HSQC	75
6.1.1.5 HMBC	76
6.1.2 Espetros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 2	77
6.1.2.1 ¹ H-RMN	77
6.1.2.2 ¹³ C-RMN	78
6.1.2.3 COSY	79
6.1.2.4 HSQC	80
6.1.2.5 HMBC	81
6.1.3 Espetros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 3	82
6.1.3.1 ¹ H-RMN	82
6.1.3.2 ¹³ C-RMN	83
6.1.3.3 COSY	84
6.1.3.4 HSQC	85
6.1.3.5 HMBC	86
6.1.4 Espetros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 4	87
6.1.4.1 ¹ H-RMN	87
6.1.4.2 ¹³ C-RMN	88
6.1.4.3 COSY	89
6.1.4.4 HSQC	90
6.1.4.5 HMBC	91
6.1.5 Espetros de ¹ H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 5	92
6.1.5.1 ¹ H-RMN	92

6.1.5.2 ^{13}C -RMN	93
6.1.5.3 COSY	94
6.1.5.4 HSQC	95
6.1.5.5 HMBC	96
6.1.6 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 6	97
6.1.6.1 - ^1H -RMN	97
6.1.6.2 - ^{13}C -RMN	98
6.1.6.3 - COSY	99
6.1.6.4 - HSQC	100
6.1.6.5 - HMBC	101
6.1.7 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 7	102
6.1.7.1 - ^1H -RMN	102
6.1.7.2 - ^{13}C -RMN	103
6.1.7.3 - COSY	104
6.1.7.4 - HSQC	105
6.1.7.5 - HMBC	106
6.1.8 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 8	107
6.1.8.1 - ^1H -RMN	107
6.1.8.2 - ^{13}C -RMN	108
6.1.8.3 - COSY	109
6.1.8.4 - HSQC	110
6.1.8.5 - HMBC	111
6.1.9 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 9	112
6.1.9.1 - ^1H -RMN	112
6.1.9.2 - ^{13}C -RMN	113
6.1.9.3 - COSY	114
6.1.9.4 - HSQC	115
6.1.9.5 - HMBC	116
6.1.10 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 11	117
6.1.10.1 ^1H -RMN	117
6.1.10.2 ^{13}C -RMN	118
6.1.10.3 COSY	119
6.1.10.4 HSQC	120
6.1.10.5 HMBC	121
6.1.11 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 13	122
6.1.11.1 ^1H -RMN	122

6.1.11.2 ^{13}C -RMN	123
6.1.11.3 COSY	124
6.1.11.4 HSQC	125
6.1.11.5 HMBC	126
6.1.12 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 16	127
6.1.12.1 ^1H -RMN	127
6.1.12.2 ^{13}C -RMN	128
6.1.12.3 COSY	129
6.1.12.4 HSQC	130
6.1.12.5 HMBC	131
6.1.13 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto 20	132
6.1.13.1 ^1H -RMN	132
6.1.13.2 ^{13}C RMN	133
6.1.13.3 COSY	134
6.1.13.4 HSQC	135
6.1.13.5 HMBC	136

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Representação esquemática de uma célula animal, com os principais organelos (traduzida de ¹³).....	1
Figura 1.2 - Estrutura da UDP-Gal, um açúcar de nucleósido difosfato.....	2
Figura 1.3 - Representação esquemática pormenorizada dos dois mecanismos catalíticos presentes em glicosiltransferases. a) Mecanismo catalítico de glicosiltransferases inversoras, em que existe uma reação do tipo S _N 2, passando apenas por um estado de transição com um ião do tipo oxicarbénio. b) Proposta inicial de mecanismo catalítico de glicosiltransferases retentoras, baseado no mecanismo catalítico de glicosidases retentoras, envolvendo a formação de um intermediário em que o dador de glicosilo se encontra ligado covalentemente à enzima. Abreviaturas: R – Nucleósido Monofosfato; R'OH – Aceitador de glicosilo. (traduzida de ¹⁷).....	4
Figura 1.4 - Proposta de mecanismo do tipo S _N i para glicosiltransferases retentoras mais aceite atualmente (adaptada de ¹⁷).	6
Figura 1.5 - Representação das estruturas dos antígenos ABH, responsáveis pelos grupos sanguíneos ABO (adaptado de ²⁶).	6
Figura 1.6 - Representação esquemática da diversidade de glicoconjugados existentes (adaptado de ¹).	7
Figura 1.7 - Estrutura geral de um nucleósido/nucleótido. R = OH - Ribose; R = H - Desoxiribose; n=0 - Nucleósido; n=1 - Nucleósido Monofosfato; n=2 - Nucleósido Difosfato; n=3 - Nucleósido Trifosfato.	9
Figura 1.8 - Estrutura do AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina), um nucleósido com interesse terapêutico no combate ao HIV.....	9
Figura 1.9 - Estrutura da UDP-Gal, um açúcar de nucleósido difosfato.....	10
Figura 1.10 - Esquema simplificado do conceito de um mimético bissubstrato.....	10
Figura 1.11 - Estrutura de um análogo de UDP-Gal contendo um grupo metilenodifosfonato como mimético do grupo difosfato.	11
Figura 1.12 - Estrutura de um análogo de UDP-Gal baseada num sistema C-glicosil fosfonofosfonato como mimético do grupo difosfato.	11
Figura 1.13 - Estruturas de análogos da UDP-Gal contendo unidades C-glicosil alquílicas como miméticos do grupo difosfato. Dentro deste tipo de compostos foram desenvolvidos: a) compostos C-glicosil metílicos ³⁵ ; b) compostos C-glicosil etílicos ⁴⁴ ; e c) compostos C-glicosil propílicos. ⁴⁵	11
Figura 1.14 - Estrutura de um análogo da UDP-Gal contendo um aminoácido (Tryptofano) como mimético do complexo metal-difosfato.....	12
Figura 1.15 - Estruturas de análogos contendo piridina: (a) Estrutura simplificada deste tipo de análogos; (b) Estrutura de um análogo de UDP-Gal em que X=OCH ₂ e Y=CONH; (c) Estrutura de um análogo da UDP-Gal em que X=1,4-Triazole e Y=CONH; (d) Estrutura de um análogo da UDP-GalNAc em que X=CONH e Y=1,4-Triazole.	12
Figura 1.16 - Estrutura de um análogo da ADP-Fuc contendo um grupo N-sulfonil carbamato. 12	
Figura 2.1 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos 1 e 5 (N: Nucleósido (1); A: Azida (5); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt).	23
Figura 2.2 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos 2 e 5 (N: Nucleósido (2); A: Azida (5); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt)	24
Figura 2.3 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos 3 e 5 (N: Nucleósido (3); A: Azida (5); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt).	25
Figura 2.4 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos 4 e 5 (N: Nucleósido (4); A: Azida (5); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt)	27

Figura 2.5 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com apenas meio de cultura durante 24h, e subsquentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripano.	32
Figura 2.6 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO durante 24h, e subsquentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripano.	32
Figura 2.7 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 0,5% de DMSO durante 24h, e subsequentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripano.	33
Figura 2.8 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a um poço contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO durante 24h, antes da remoção de parte do meio de cultura e aplicação do método de exclusão com azul tripano.	33
Figura 2.9 - Fotografia tirada, com ampliação 200x, a uma subcultura de células MDA-MB-231 durante a realização desta dissertação, notando-se a morfologia estelar característica desta cultura celular.	34
Figura 2.10 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231 depois de 24h de contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO.	35
Figura 2.11 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 24h de contacto com meio de cultura suplementado com 0,5% de DMSO.	36
Figura 2.12 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 24h de contacto com apenas meio de cultura.	36
Figura 2.13 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por apenas meio de cultura.	37
Figura 2.14 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por apenas meio de cultura.	38
Figura 2.15 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com apenas meio de cultura.	38
Figura 2.16 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com apenas meio de cultura.	39
Figura 2.17 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por meio de cultura contendo o composto 7 solubilizado em 0,5% de DMSO.	40
Figura 2.18 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por meio de cultura contendo o composto 7 solubilizado em 0,5% de DMSO.	40
Figura 2.19 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com o composto 7 , solubilizado em 0,5% de DMSO.	41
Figura 2.20 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com o composto 7 , solubilizado em 0,5% de DMSO.	41
Figura 3.1 - Fotografia retirada a uma cultura celular da linha celular MDA-MB-231, onde se pode verificar a existência das extensões estreladas características desta linha celular (adaptada de ⁵⁹).	62
Figura 3.2 - Estrutura química do corante azul tripano na sua forma ionizada.	64
Figura 6.1 - Espetro de ¹ H-RMN do composto 1	72
Figura 6.2 - Espetro de ¹³ C-RMN do composto 1	73
Figura 6.3 - Espetro de COSY do composto 1	74
Figura 6.4 - Espetro de HSQC do composto 1	75
Figura 6.5 - Espetro de HMBC do composto 1	76

Figura 6.6 - Espetro de ^1H -RMN do composto 2	77
Figura 6.7 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 2	78
Figura 6.8 - Espetro de COSY do composto 2	79
Figura 6.9 - Espetro de HSQC do composto 2	80
Figura 6.10 - Espetro de HMBC do composto 2	81
Figura 6.11 - Espetro de ^1H -RMN do composto 3	82
Figura 6.12 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 3	83
Figura 6.13 - Espetro de COSY do composto 3	84
Figura 6.14 - Espetro de HSQC do composto 3	85
Figura 6.15 - Espetro de HMBC do composto 3	86
Figura 6.16 - Espetro de ^1H -RMN do composto 4	87
Figura 6.17 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 4	88
Figura 6.18 - Espetro de COSY do composto 4	89
Figura 6.19 - Espetro de HSQC do composto 4	90
Figura 6.20 - Espetro de HMBC do composto 4	91
Figura 6.21 - Espetro de ^1H -RMN do composto 5	92
Figura 6.22 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 5	93
Figura 6.23 - Espetro de COSY do composto 5	94
Figura 6.24 - Espetro de HSQC do composto 5	95
Figura 6.25 - Espetro de HMBC do composto 5	96
Figura 6.26 - Espetro de ^1H -RMN do composto 6	97
Figura 6.27 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 6 , com supressão do sinal de solvente.....	98
Figura 6.28 - Espetro de COSY do composto 6	99
Figura 6.29 - Espetro de HSQC do composto 6	100
Figura 6.30 - Espetro de HMBC do composto 6	101
Figura 6.31 - Espetro de ^1H -RMN do composto 7	102
Figura 6.32 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 7	103
Figura 6.33 - Espetro de COSY do composto 7	104
Figura 6.34 - Espetro de HSQC do composto 7	105
Figura 6.35 - Espetro de HMBC do composto 7	106
Figura 6.36 - Espetro de ^1H -RMN do composto 8	107
Figura 6.37 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 8	108
Figura 6.38 - Espetro de COSY do composto 8	109
Figura 6.39 - Espetro de HSQC do composto 8	110
Figura 6.40 - Espetro de HMBC do composto 8	111
Figura 6.41 - Espetro de ^1H -RMN do composto 9	112
Figura 6.42 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 9	113
Figura 6.43 - Espetro de COSY do composto 9	114
Figura 6.44 - Espetro de HSQC do composto 9	115
Figura 6.45 - Espetro de HMBC do composto 9	116
Figura 6.46 - Espetro de ^1H -RMN do composto 11	117
Figura 6.47 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 11	118
Figura 6.48 - Espetro de COSY do composto 11	119
Figura 6.49 - Espetro de HSQC do composto 11	120
Figura 6.50 - Espetro de HMBC do composto 11	121
Figura 6.51 - Espetro de ^1H -RMN do composto 13	122
Figura 6.52 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 13	123
Figura 6.53 - Espetro de COSY do composto 13	124

Figura 6.54 - Espetro de HSQC do composto 13	125
Figura 6.55 - Espetro de HMBC do composto 13	126
Figura 6.56 - Espetro de ^1H -RMN do composto 16	127
Figura 6.57 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 16	128
Figura 6.58 - Espetro de COSY do composto 16	129
Figura 6.59 -- Espetro de HSQC do composto 16	130
Figura 6.60 - Espetro de HMBC do composto 16	131
Figura 6.61 - Espetro de ^1H -RMN do composto 20	132
Figura 6.62 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto 20	133
Figura 6.63 - Espetro de COSY do composto 20	134
Figura 6.64 - Espetro de HSQC do composto 20	135
Figura 6.65 - Espetro de HMBC do composto 20	136

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 - Representação esquemática de uma reação de glicosilação usando glicosiltransferases (adaptada de ¹⁴). -----	2
Esquema 1.2 - Esquema simplificado dos dois tipos de mecanismos de ação presentes em glicosiltransferases. É de notar a inversão de configuração da ligação anomérica ($\alpha \rightarrow \beta$) no dador de glicosilo no caso da glicosiltransferase inversora. -----	2
Esquema 2.1 - Descrição geral da síntese dos compostos 6 a 9 .-----	13
Esquema 2.2 - Esquema geral da síntese dos precursores de nucleósido (1) a (4). -----	14
Esquema 2.3 - Esquema geral da síntese do precursor 6-Azido glucósido de metilo (5). -----	14
Esquema 2.4 - Esquema reacional da reação de abertura da 1,2-isopropilideno- γ -glucofuranurolactona 10 . -----	14
Esquema 2.5 - Esquema geral da síntese dos nucleósidos de piranosilo precursores 1 e 2 , a partir da <i>N</i> -propargil-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida 11 .-----	15
Esquema 2.6 - Esquema reacional da síntese da <i>N</i> -propargil-1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopirauronamida 13 , incluindo o composto intermediário 12 .-----	15
Esquema 2.7 - Esquema ilustrativo do mecanismo de formação do intermediário 12 .-----	15
Esquema 2.8 - Esquema reacional da reação de acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina ao composto <i>N</i> -propargil-1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopirauronamida 13 . -----	16
Esquema 2.9 - Esquema representativo do mecanismo da reação de N-glicosilação, usando como dador de glicosilo um derivado peracetilado e uma base azotada sililada previamente. É de notar que o mecanismo apresentado apenas ilustra a formação do isómero N ⁹ . No caso do isómero N ⁷ , a posição sililada é a N ⁹ .-----	17
Esquema 2.10 - Representação esquemática das correlações em HMBC, entre H-8, H-1', C-4 e C-5 em purinas N ₉ -glicosiladas a). As correlações possíveis para H-8 encontram-se representadas a vermelho e as correlações de H-1' a verde. No caso de purinas N ₇ -glicosiladas, a intersecção das duas séries de correlações seria em C-5 b).-----	17
Esquema 2.11 - Esquema geral da síntese dos nucleósidos de furanosilo precursores a partir da <i>N</i> -propargil-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida 11 . -----	18
Esquema 2.12 - Esquema reacional da síntese da <i>N</i> -propargil-1,2,3,5-tetra-O-acetil-D-glucofuranuronamida 16 , incluindo os compostos intermediários 14 e 15 .-----	18
Esquema 2.13 - Esquema reacional da reação de acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina ao composto <i>N</i> -propargil-1,2,3,5-tetra-O-acetil-glucofuranuronamida (16).-----	19
Esquema 2.14 - Esquema geral da síntese do 6-Azido-2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucósido de metilo 5 , a partir do α -D-glucósido de metilo 17 . -----	20
Esquema 2.15 - Esquema reacional da síntese do 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucósido de metilo 20 , incluindo os compostos intermediários 18 e 19 . -----	21
Esquema 2.16 - Esquema reacional da síntese do 6-azido-2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucósido de metilo 5 , a partir do 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucósido de metilo 20 , incluindo o intermediário 21 . ----	22
Esquema 2.17 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos 1 e 5 . -----	23
Esquema 2.18 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos 2 e 5 . -----	24
Esquema 2.19 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos 3 e 5 . -----	25
Esquema 2.20 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos 4 e 5 . -----	26
Esquema 3.1 - Representação esquemática da estratégia de dissolução do composto 6 . -----	63

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Características dos 4 compostos sintetizados quanto ao anel de nucleósido, a regioquímica da ligação N-glicosídica, a sua massa molar e LogP calculado no programa ChemsSketch 12.0.....	29
Tabela 2.2 - Tabela representativa dos resultados dos ensaios de solubilidade realizados à concentração de 1mM.	30

Lista de Abreviaturas

Ac₂O – Anidrido Acético

AcOEt – Acetato de Etilo

AcOH – Ácido Acético

AI – Atmosfera Inerte

Asp – Ácido Aspártico

BSA – *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

COSY – Correlation Spectroscopy

CyHex – Ciclo-hexano

d – Duplete

dd – Duplete duplo

ddd – Duplo de duplete duplo

dl – Duplete largo

DMEM – Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

DMF – *N,N*-Dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Et. Pet. – Éter de Petróleo

GlcNAc – *N*-Acetilglucosamina

GR – Grupo Rejeitado

FBS – Soro Fetal Bovino

Fuc – Fucose

FucT-VIII – 6- α -L-fucosiltransferase glicoproteica EC 2.4.1.68

Gal – Galactose

GalNAc – *N*-Acetilgalactosamina

h – Horas

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Protão

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HSQC – Heteronuclear Single-Quantum Correlation

J – Constante de Acoplamento

m – Multipleteo

Man – Manose

n-Hex – *n*-Hexano

Neu5Ac – Ácido N-Acetilneuramínico

PBS – Tampão Fosfato Salino

ppm – Partes por Milhão

R_f – Fator de Retenção

s – Singleto

Ser – Serina

sl – Singleto largo

t – Tripleto

TA – Temperatura Ambiente

TFA – Ácido Trifluoroacético

tl – Tripleto largo

TLC – Cromatografia em Camada Fina

TMSOTf – Trimetilsilil trifluorometanosulfonato







Tr – Tritilo

Ts – Tosilo

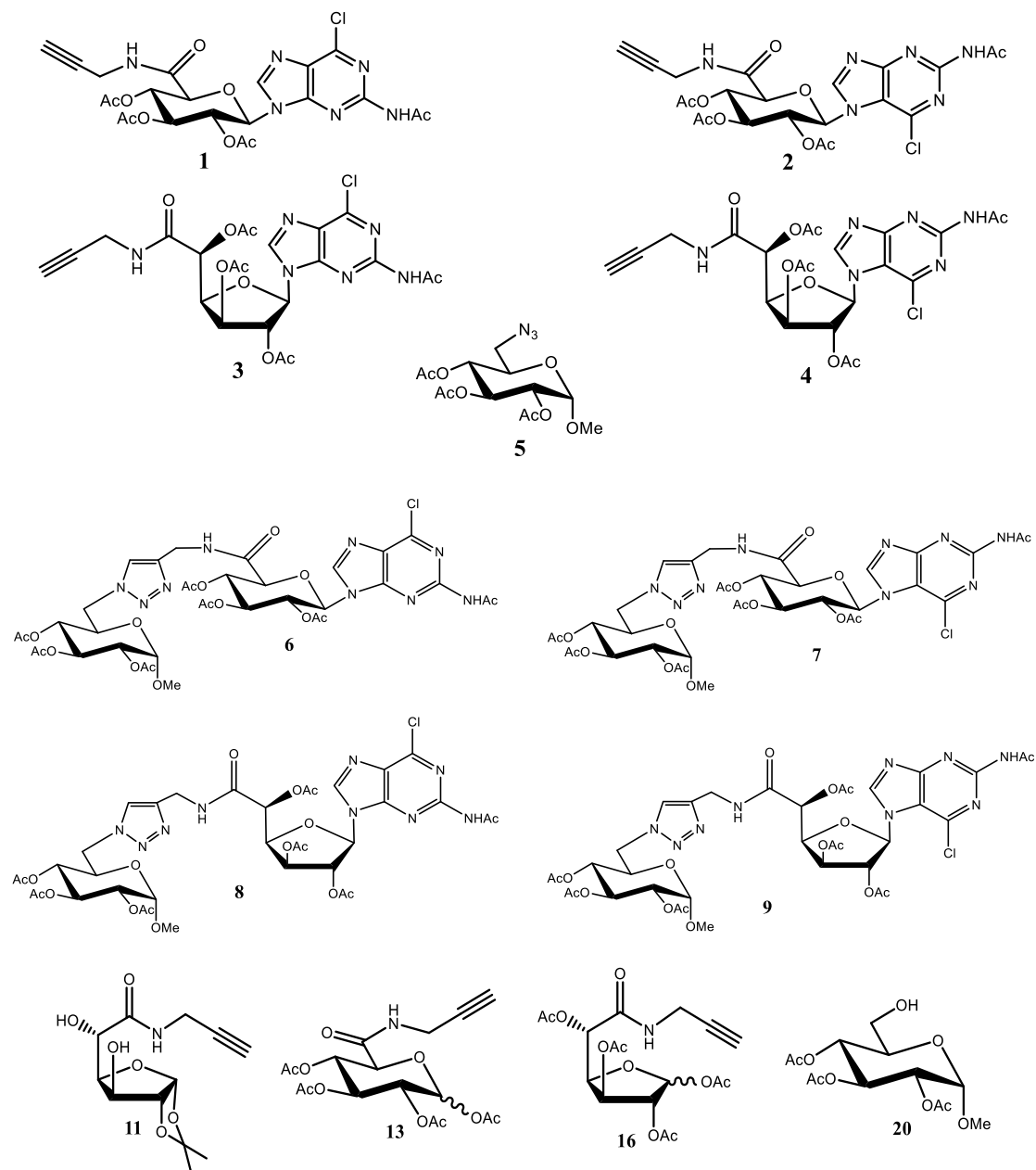
UDP – Uridina Difosfato

Xyl – Xilose

Simbologia Usada em Glicobiologia (adaptado de ¹⁰)

Símbolo	Monossacárido
	GlcNAc
	Fuc
	Man
	Gal
	Neu5Ac
	Xyl

Lista de Compostos Sintetizados



Capítulo 1 – Introdução

1.1 O que é a Glicosilação?

A glicosilação é uma reação que permite a transferência de unidades glicosílicas para outras moléculas, podendo ser química ou enzimática. Como evento biológico, é um processo enzimático que permite a formação de ligações glicosídicas entre dois sacáridos, ou, no caso de proteínas, uma modificação pós-traducional, funcionando como um mecanismo crucial no controlo de muitos processos fisiopatológicos. Entre estes processos, encontram-se a maturação e renovação proteica, adesão celular, ativação de recetores, resposta imunológica e o processo inflamatório.¹⁻⁷

Um aspeto importante da glicosilação é a sua presença em todas as células, estando na origem do glicocálix, uma matriz extracelular composta por glicolípidos e glicoproteínas, revestindo as células. Nesta matriz, camadas de sacárido encontram-se ligados a proteínas e lípidos membranares e estão envolvidos em alguns dos processos fisiopatológicos referidos anteriormente. Às cadeias polissacarídicas presentes nos glicoconjugados dá-se o nome de glicanos.^{2,6}

A glicosilação de proteínas ocorre maioritariamente no lúmen do retículo endoplasmático e no complexo de Golgi^{2,6,10,11}, embora também possa ocorrer no citoplasma e no núcleo como é o caso da glicosilação catalisada pela O-GlcNAc transferase proteica (OGT) (Figura 1.1), que é uma glicosiltransferase que transfere, de forma reversível, uma unidade de GlcNAc para uma proteína.^{2-4,12}

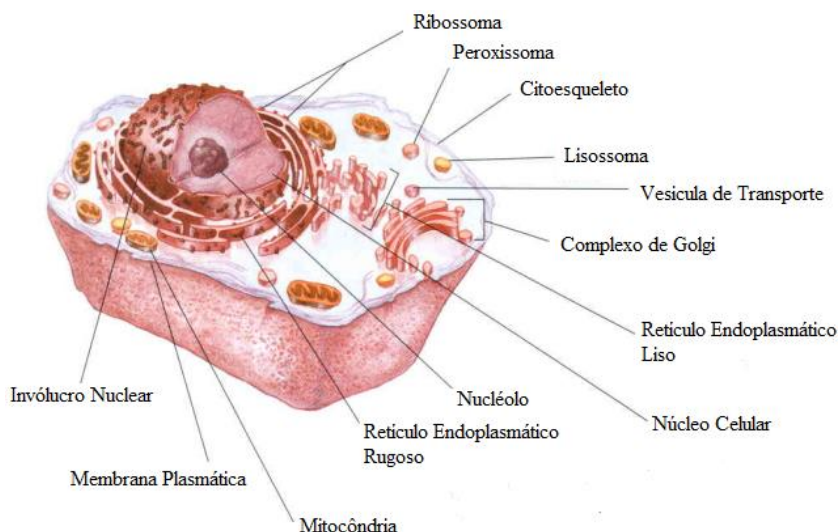


Figura 1.1 - Representação esquemática de uma célula animal, com os principais organelos (traduzida de ¹³).

1.1.1 O que são Glicosiltransferases?

As principais enzimas envolvidas na glicosilação são as glicosiltransferases, catalisando a reação entre um dador de glicosilo, um derivado de um mono ou oligossacárido com um bom grupo rejeitado, e um aceitador de glicosilo, normalmente um derivado de um mono ou oligossacárido com, pelo menos, um grupo hidroxilo livre, atuando como nucleófilo (Esquema 1.1).^{10,14} Os dadores de glicosilo são normalmente açúcares de nucleósido difosfato (Figura 1.2) nos quais o nucleósido difosfato funciona como grupo rejeitado.^{10,14}



Esquema 1.1 - Representação esquemática de uma reação de glicosilação usando glicosiltransferases (adaptada de ¹⁴).

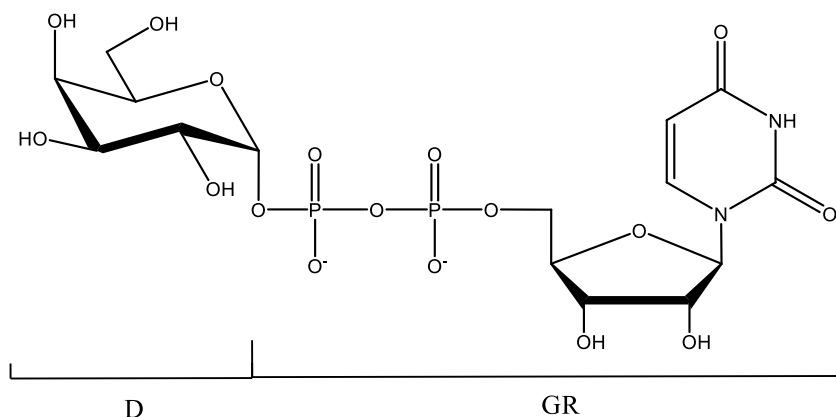
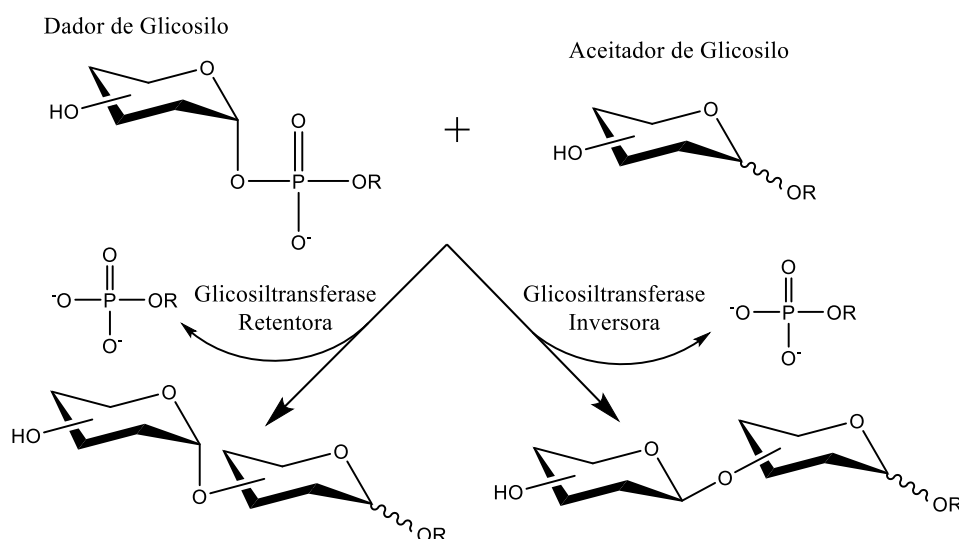


Figura 1.2 - Estrutura da UDP-Gal, um açúcar de nucleósido difosfato.

As glicosiltransferases dividem-se em dois grandes grupos, as do tipo Leloir e não-Leloir, em homenagem a Luis Leloir, recipiente do Nobel da Química em 1970.^{14,15}

As glicosiltransferases do tipo Leloir caracterizam-se por usarem açúcares de nucleósido difosfato como dadores de glicosilo.^{14,16,17} As glicosiltransferases do tipo não-Leloir caracterizam-se pelo uso de outras fontes de glicosilo como sacarose, sendo que a sua maioria são glucosil- e fructosiltransferases.¹⁷

As glicosiltransferases também se podem classificar em dois grandes tipos, ou uma variação destes, de acordo com o “*folding*” ou enovelamento geral da enzima, denominados de GT-A e GT-B. Dentro destes dois tipos, as glicosiltransferases podem dividir-se em dois tipos, de acordo com o seu mecanismo de ação, podendo reter ou inverter a configuração estereoquímica na posição anomérica do dador de glicosilo (Esquema 1.2).¹⁵



Esquema 1.2 - Esquema simplificado dos dois tipos de mecanismo de ação presentes em glicosiltransferases. É de notar a inversão de configuração da ligação anomérica ($\alpha \rightarrow \beta$) no dador de glicosilo no caso da glicosiltransferase inversora.

Apesar da complexidade na diferenciação das glicosiltransferases, a base de dados Carbohydrate-Active enZYmes (CAZy) compila os dados conhecidos de todas as glicosiltransferases em 107 categorias (GT0 a GT106).^{18,19}

1.1.1.1 Glicosiltransferases Inversoras

O mecanismo catalítico das glicosiltransferases inversoras envolve uma reação do tipo S_N2 , com rejeição direta do grupo rejeitado. Mais concretamente, uma cadeia lateral no centro ativo, funcionando como base catalítica, promove a desprotonação do grupo hidroxilo do aceitador de glicosilo, facilitando o ataque nucleofílico deste e a rejeição do grupo abandonante (Figura 1.3a).¹⁵

A grande maioria das glicosiltransferases inversoras com “folding” do tipo GT-A analisadas utilizam um ião divalente como o Mg^{2+} ou Mn^{2+} , como estabilizadores da carga negativa formada pela rejeição do nucleósido difosfato, facilitando assim a expulsão deste. No entanto, existem algumas exceções como certas sialiltransferases da família GT42, e uma β -1,6-GlcNAc transferase da família GT14, em que o ião metálico presente não é relevante.¹⁵ Estas glicosiltransferases usam, respetivamente, grupos hidroxilo de resíduos de tirosina e aminoácidos básicos, como estabilizadores dos grupos rejeitados.^{20,21}

As glicosiltransferases da família GT1, responsáveis pela glicosilação de vários tipos de moléculas orgânicas, tais como terpenos, antocianinas e esteroides, possuem um “folding” do tipo GT-B. Devido à sua grande abrangência de substratos, estas glicosiltransferases têm sido estudadas intensamente. O estudo de três enzimas deste tipo envolvidas na biossíntese do antibiótico Vancomicina, um glicopéptido usado no combate a infeções graves por bactérias Gram-positivas, sugere que estas utilizam os grupos laterais do aminoácido Asp como bases catalíticas, e que a rejeição do grupo abandonante é facilitada por interações com grupos hidroxilo laterais e grupos imidazole, que estabilizam a carga negativa formada.²²

Outras glicosiltransferases inversoras do tipo GT-B estudadas incluem a FucT-VIII e as fucosiltransferases da família GT10, sendo os resultados análogos aos encontrados para as glicosiltransferases da família GT1.¹⁵

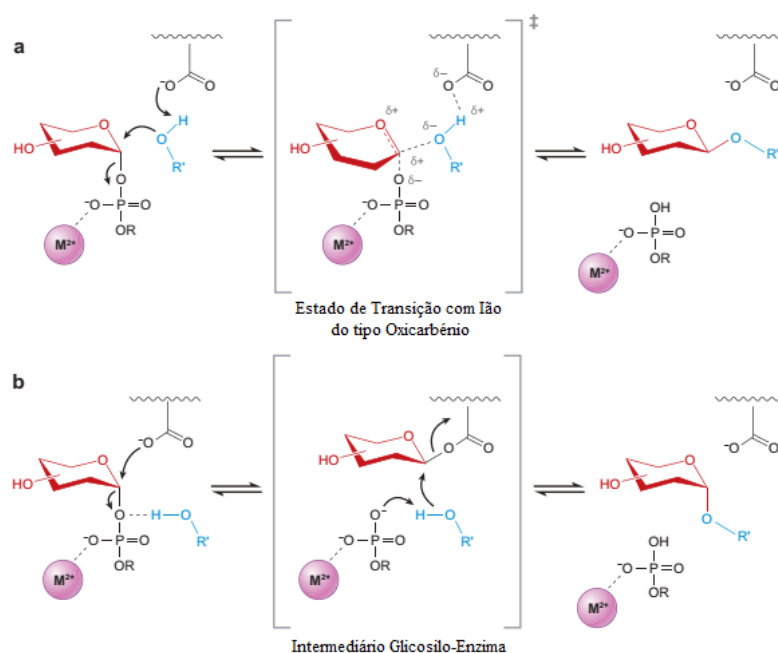


Figura 1.3 - Representação esquemática pormenorizada dos dois mecanismos catalíticos presentes em glicosiltransferases. a) Mecanismo catalítico de glicosiltransferases inversoras, em que existe uma reação do tipo S_N2 , passando apenas por um estado de transição com um íon do tipo oxicarbênio. b) Proposta inicial de mecanismo catalítico de glicosiltransferases retentoras, baseado no mecanismo catalítico de glicosidases retentoras, envolvendo a formação de um intermediário em que o dador de glicosilo se encontra ligado covalentemente à enzima. Abreviaturas: R – Nucleósido Monofosfato; $R'OH$ – Aceitador de glicosilo (traduzida de ¹⁵).

1.1.1.2 Glicosiltransferases Retentoras

O estudo mecanístico das glicosiltransferases retentoras tem sido complicado, muito ligado ao estudo mecanístico das glicosidases retentoras, que, geralmente, envolve a rejeição do grupo rejeitado por ataque nucleofílico de um grupo lateral da enzima, potenciado pela interação do aceitador de glicosilo, formando um intermediário em que o dador de glicosilo se encontra ligado covalentemente à enzima com inversão da estereoquímica, sofrendo depois ataque nucleofílico por parte do aceitador de glicosilo, restaurando a estereoquímica original (Figura 1.3b).

Este mecanismo foi inicialmente proposto por Koshland ²³, que verificou que, devido ao facto da inversão de configuração ser uma propriedade fundamental e universal de substituições bimoleculares em carbonos saturados, as glicosidases que formam compostos sacarídicos mantendo a configuração anomérica do substrato teriam que catalisar a reação em dois passos de substituição nucleofílica distintos, envolvendo um nucleófilo enzimático como catalisador. ^{15,23}

Posteriormente, foi proposto um mecanismo alternativo do tipo S_N1 de acordo com os resultados encontrados por Phillips para uma glicosidase retentora presente na clara do ovo de galinha, a lisozima. ²⁴ Este mecanismo alternativo envolve a formação de um intermediário distinto contendo um íon oxicarbênio enzimaticamente estabilizado, protegido numa das faces pela enzima, impedindo o ataque nucleofílico na face oposta, permitindo assim a retenção completa da configuração anomérica. ^{15,24}

No entanto, com o avanço da caracterização estrutural das glicosiltransferases retentoras do tipo GT-A, verificou-se que ambos os mecanismos previamente propostos, baseados nos mecanismos encontrados em glicosidases, não se adequavam aos resultados encontrados, pois, por um lado, existem regiões do centro ativo semelhantes a outras glicosiltransferases, e outras que possuem grandes diferenças. ¹⁵

À semelhança das glicosiltransferases inversoras do mesmo tipo, as glicosiltransferases retentoras do tipo GT-B também usam grupos miméticos ao íão metálico divalente como facilitadores da saída do grupo rejeitado.¹⁵

O mecanismo que atualmente reúne o maior consenso é uma reação do tipo SN_i , uma reação derivada da SN_1 , descrita inicialmente como forma de explicar os resultados da decomposição de clorosulfitos alquílicos. Em 1980, este tipo de reação foi usado, por Sinnott e Jencks, para explicar a retenção de configuração anomérica, sob certas condições, nos produtos da solvólise de derivados glucosídicos em etanol e trifluoretanol. As reações do tipo SN_i caracterizam-se por serem reações do tipo SN_1 , em que o nucleófilo provém da decomposição do grupo rejeitado e ataca pela mesma face.¹⁵

Este mecanismo envolve, em primeiro lugar, a formação de um estado de transição contendo um íão do tipo oxicarbénio, em que o aceitador de glicosilo interage com o grupo abandonante, permitindo a interação do par de eletrões deslocalizado do grupo amida da enzima, havendo assim a rejeição do grupo abandonante.

De seguida, existe a formação, por um tempo reduzido, de um intermediário contendo um par de íão oxicarbénio-(aceitador de glicosilo + grupo rejeitado), que deixa de existir após uma movimentação do catião no centro ativo de forma a que o aceitador de glicosilo ocupe a posição inicialmente ocupada pelo grupo rejeitado na face inferior do monossacárido dador, voltando a um estado de transição contendo um íão do tipo oxicarbénio, que por sua vez origina o produto com retenção da configuração anomérica (Figura 1.4).

O motivo pelo qual este mecanismo é preterido em relação a outros centra-se na falta de evidências para a existência de outros mecanismos ¹⁵, apesar de nas palavras de Sinnott, “a evidência a favor do mecanismo (do tipo SN_i) ... é essencialmente negativa”.²⁵

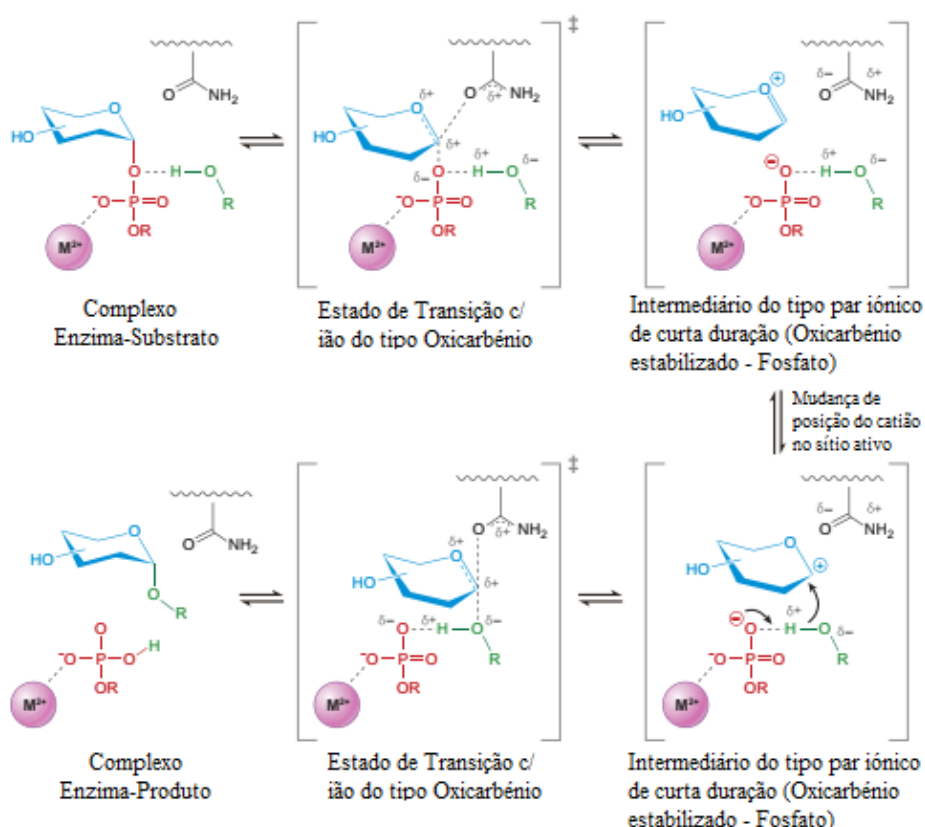


Figura 1.4 - Proposta de mecanismo do tipo SN_i para glicosiltransferases retentoras mais aceite atualmente (traduzida e adaptada de ¹⁵).

1.1.1.3 Especificidade Enzima-Substrato

As glicosiltransferases mostram ser altamente específicas tanto para o doador como para o aceitador de glicosilo, ^{7,10,14} tendo sido lançada a hipótese “uma enzima, uma ligação”, pelo grupo de Saul Roseman, isto é, apenas uma enzima pode fazer uma certa ligação.¹⁰ Um exemplo da elevada especificidade das glicosiltransferases é a ação da fucosilgalactosido-3- α -galactosiltransferase, envolvida na formação do o antigene B dos grupos sanguíneos AB0 (Figura 1.5), que introduz uma unidade de Gal a uma outra unidade de Gal, apenas se esta estiver modificada com uma unidade de Fuc ligada por uma ligação α 1-2.¹⁰

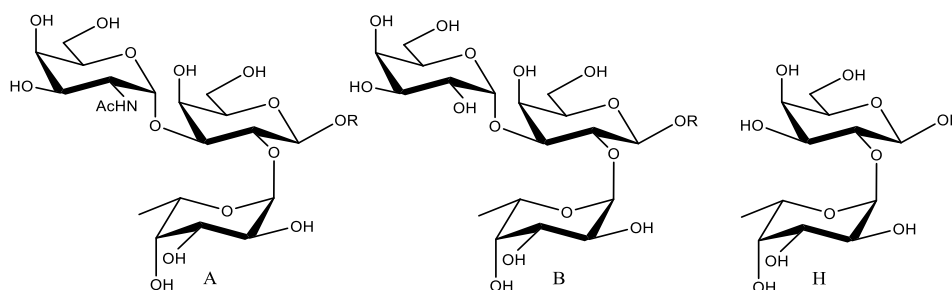


Figura 1.5 - Representação das estruturas dos antígenos ABH, responsáveis pelos grupos sanguíneos AB0 (adaptado de ²⁶).

Esta elevada especificidade poderia ser muito usada em síntese de oligossacáridos, mas existem problemas em obter enzimas puras, pois estas podem adquirir estruturas instáveis, bem como a sua própria especificidade, já que seria necessário ter sempre o aceitador ideal para a reação.¹⁴

1.2 Tipos de Glicosilação

Os tipos de glicanos encontrados nas células definem-se, em primeiro lugar, pelo tipo de ligação que possuem com o glicoconjugado, que pode ser uma proteína ou um lípido, sendo que existem 3 grandes tipos de glicoconjugados: glicoproteínas, proteoglicanos e glicolípidos (Figura 1.6).^{5,6}

Dentro das glicoproteínas, que se definem como sendo proteínas com, pelo menos, um glicano ligado covalentemente. Aqui inserem-se a N-glicosilação e a O-glicosilação.^{1,6}

Os proteoglicanos definem-se como sendo proteínas em que, pelo menos, uma cadeia de glicosaminoglicanos (GAG), como o sulfato de heparano, estão covalentemente ligadas à proteína, por uma zona central contendo uma unidade de Xyl, a grupos hidroxilo em resíduos de Ser.^{1,6}

Os glicolípidos, como o nome indica, são glicanos ligados a lípidos, onde se inserem os glicosfingolípidos.^{1,5,6}

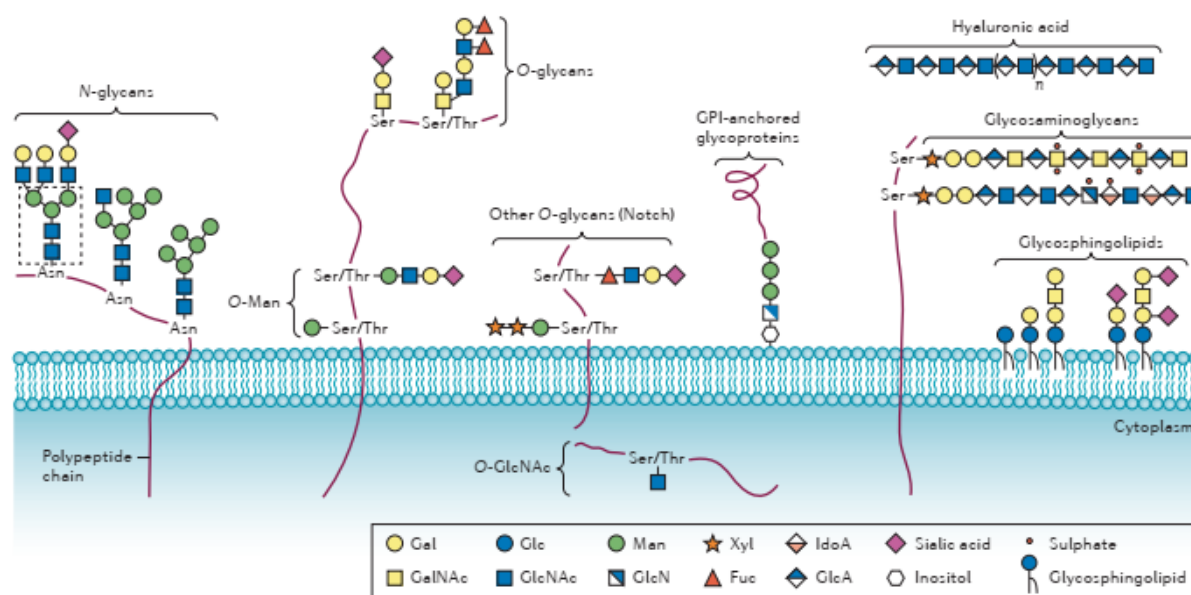


Figura 1.6 - Representação esquemática da diversidade de glicoconjugados existentes (adaptado de ¹).

1.3 Glicosilação no Cancro

O cancro é um conjunto de patologias que se podem formar num qualquer órgão do corpo e se caracterizam por vários fatores como a formação de células de uma forma desregulada; a capacidade de invadir outros órgãos; uma redução na diferenciação celular; e a indução da angiogénese.^{5,7,27}

Os “hallmarks” do cancro definem-se as características biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de um tumor. Atualmente, existem 10 “hallmarks”, 8 originais, sendo elas a autossuficiência em sinalizadores de crescimento; evasão a supressores de crescimento; resistência à morte celular; indução da angiogénese; ativação metastática e de invasão celular; reprogramação do metabolismo celular; capacitar a imortalidade replicativa; e evitar o ataque imune, e 2 adicionadas posteriormente, sendo elas a instabilidade genómica e mutagénica; e a inflamação promotora de tumores.^{7,27,28}

A glicosilação aberrante, isto é, a alteração dos padrões de glicosilação, pode também ser considerada uma característica do cancro, devido à sua presença nos diferentes estádios do cancro e à capacidade de afetar outras características do cancro.⁵

1.3.1 Tipos de Alterações na Glicosilação

A glicosilação de proteínas é regulada por mecanismos complexos, como a expressão e localização das glicosiltransferases, o rácio enzima/substrato.^{1,2} A sua desregulação no cancro tem um papel fulcral em várias vertentes como a progressão do cancro; angiogénese; metástase; adesão célula-célula; sinalização; e a transição epitelial-mesenquimal (EMT).^{7,29}

Mecanicamente, as alterações nos padrões de glicosilação seguem um de dois processos, postulados por Hakomori e Kannagi, chamados de processo de síntese incompleta e o processo neo-sintético.^{1,26}

O processo de síntese incompleta é mais comum nos estádios mais precoces do cancro, e caracteriza-se como consequência do impedimento da normal síntese de glicanos em células epiteliais saudáveis, levando à biossíntese de estruturas truncadas, como é o caso da expressão do antígeno STn em cânceres gastrointestinais e de mama.^{1,30}

O processo neo-sintético, mais comum nos estádios mais avançados, está relacionado com a indução de certos genes, por ação do tumor, envolvidos na expressão de determinantes glicosídicos, como é o exemplo da expressão continuada de certos antígenos como o sLe^a e o sLe^x em vários tipos de cancro.^{1,26}

1.4 Nucleótidos como Inibidores de Glicosiltransferases

1.4.1 O que são Nucleósidos/Nucleótidos

Segundo a IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), um nucleótido define-se como um derivado de um nucleósido em que o grupo hidroxilo livre no carbono 5 ou 3 foi esterificado com ácido fosfórico³¹, ao passo que a comissão conjunta da IUPAC e IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) inclui, para além dos anteriores, os derivados de nucleósido di- e trifosfatados, fosfodiésteres cíclicos e açúcares de nucleósido difosfato.³²

No entanto, a definição mais geral é a da Chemical Abstracts, afiliada à ACS (American Chemical Society), que a estende a todos os derivados N-glicosilados de uma base azotada esterificados com ácido fosfórico ou polifosfóricos.³³

Um nucleósido, fisiologicamente, é composto por uma pentose (ribose ou 2-desoxiribose) ligada a uma base azotada (purina ou pirimidina) pelo carbono anomérico (Figura 1.7).¹⁴ As pirimidinas, ou seja, a citosina, timina e o uracilo, apenas possuem um anel aromático diazotado. As purinas, isto é, a adenina e a guanina, distinguem-se das pirimidinas pela presença de um anel de imidazole acoplado ao anel de pirimidina.

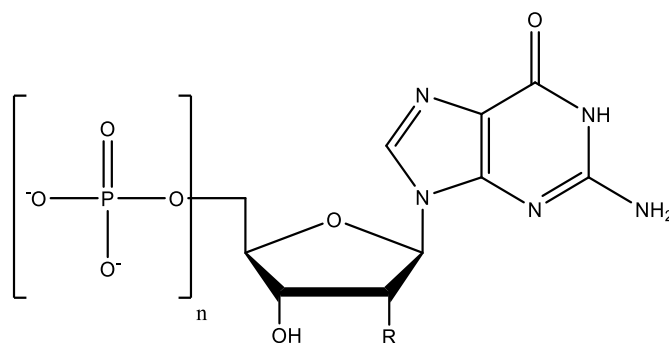


Figura 1.7 - Estrutura geral de um nucleósido/nucleótido. R = OH - Ribose; R = H - Desoxirribose; n=0 - Nucleósido; n=1 - Nucleósido Monofosfato; n=2 - Nucleósido Difosfato; n=3 - Nucleósido Trifosfato.

1.4.2 Importância dos Nucleósidos e Nucleótidos em Química Medicinal

Os nucleótidos e nucleósidos têm uma grande importância a nível biológico, visto que são parte integrante do DNA e RNA, estando presentes em muitos ciclos metabólicos, como podendo atuar como reguladores enzimáticos e sinalizadores celulares.^{16,34} Os seus análogos sintéticos são sintetizados com o objetivo de mimetizar a estrutura dos nucleósidos e nucleótidos endógenos, de forma a serem reconhecidos pelos seus alvos biológicos, podendo ser, por exemplo, incorporados nas cadeias de DNA e RNA, ou inibir a atividade de enzimas essenciais como cinases e polimerases. A incorporação destes análogos nas cadeias de DNA e RNA ou a inibição de enzimas como cinases ou polimerases, levam à morte celular.^{16,34}

As vias metabólicas dos análogos de nucleótidos e nucleósidos são semelhantes às usadas pelos nucleótidos e nucleósidos endógenos, entrando nas células usando transportadores específicos, sendo depois di e trifosforiladas por cinases, acumulando-se dentro das células cancerígenas ou infetadas com vírus.¹⁶

Um exemplo de um nucleósido com interesse terapêutico é o AZT (3'-azido-2',3'-didesoxitimidina) (Figura 1.8), um medicamento anti-HIV semelhante à desoxitimidina, existente no DNA. O AZT é um inibidor da transcriptase reversa, inibindo a transcrição do RNA viral do HIV em DNA, devido à presença de um grupo azida no carbono 3 da desoxirribose, no lugar de um grupo hidroxilo, provocando uma falha no processo de transcrição, pois a presença do grupo hidroxilo é essencial à elongação da cadeia de DNA viral.¹⁴

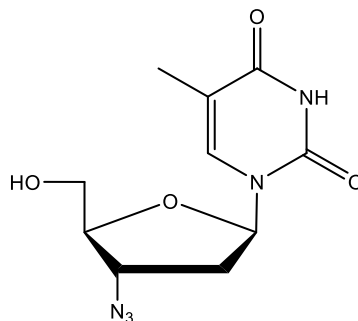


Figura 1.8 - Estrutura do AZT (3'-azido-3'-desoxitimidina), um derivado de nucleósido com interesse terapêutico no combate ao HIV.

No caso do trabalho realizado no âmbito desta dissertação novos análogos deste tipo de moléculas são sintetizados com o objetivo de poderem inibir a atividade de glicosiltransferases, o que é um

mecanismo de ação até agora relativamente menos focado por análogos de nucleótidos no contexto de potenciais terapias para o cancro.

1.4.3 Açúcares de Nucleósido Difosfato

Os açúcares de nucleósidos difosfato são um tipo de nucleótidos nos quais um sistema nucleósido 5'-difosfato se encontra ligado à posição anomérica de uma outra unidade glicosílica pelo grupo fosfato β (Figura 1.9).¹⁴ Estes compostos são substratos de glicosiltransferases, funcionando como dadores de glicosilo.^{14,35–38}

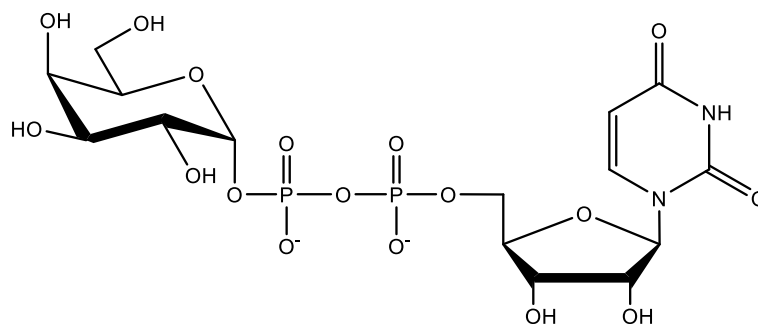


Figura 1.9 - Estrutura da UDP-Gal, um açúcar de nucleósido difosfato.

1.4.3.1 Análogos Conhecidos

Ao longo dos anos, têm sido sintetizados diversos tipos de análogos de açúcares de nucleósido difosfato com o intuito de competir com os seus compostos endógenos correspondentes, utilizando diferentes tipos de estruturas que procuram mimetizar várias secções da molécula.³⁴ Algumas das alterações já estudadas incluem modificações ao nível do anel de ribose, ao nível da base azotada³⁹, bem como unidades miméticas de monossacáridos como imino açúcares e carbaçúcares, nas quais o átomo de oxigénio endocíclico se encontra substituído por um grupo NH e um grupo CH₂, respetivamente.⁴⁰

Uma estratégia que também tem sido usada baseia-se no conceito de criar moléculas contendo um análogo de um dador de glicosilo ligado covalentemente a um monossacárido ou aminoácido, podendo assim interagir simultaneamente nos sítios da enzima onde se liga o dador e para o aceitador de glicosilo (Figura 1.10). Este conceito é conhecido como mimético bissubstrato.⁴¹

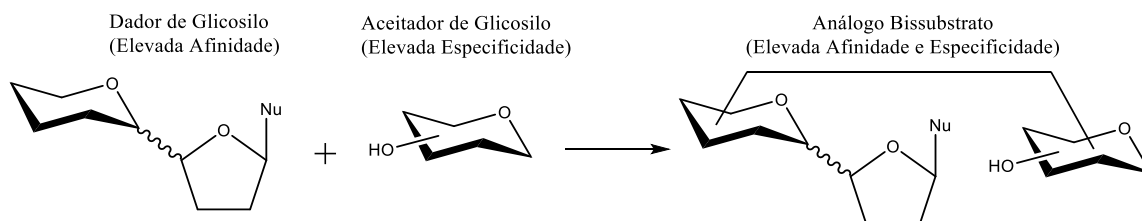


Figura 1.10 - Esquema simplificado do conceito de um mimético bissubstrato.

Como os análogos estudados nesta dissertação possuem um grupo mimético do grupo difosfato, presente na “ponte” entre a unidade monossacáridica e o fragmento nucleósido, essa classe de potenciais compostos miméticos vai ser analisada mais aprofundadamente.

Os primeiros tipos de análogos reportados na literatura incluem análogos contendo um grupo metilenodifosfonato a mimetizar o grupo difosfato (Figura 1.11)⁴², e análogos C-glicosil

fosfonofosfonato (Figura 1.12).⁴³ Este último possui uma elevada atividade inibitória contra galactosiltransferases.⁴³

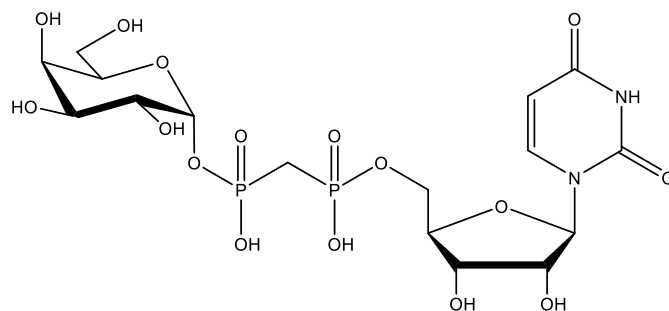


Figura 1.11 - Estrutura de um análogo de UDP-Gal contendo um grupo metilenodifosfonato como mimético do grupo difosfato.

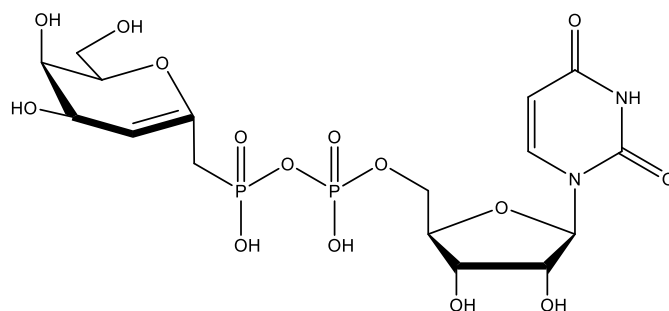


Figura 1.12 - Estrutura de um análogo de UDP-Gal baseada num sistema C-glicosil fosfonofosfonato como mimético do grupo difosfato.

Uma variedade de análogos C-glicosílicos, dentre os quais se incluem moléculas possuindo espaçadores alquílicos como substituto de parte do sistema difosfato (Figura 1.13)^{35,44,45}, tem sido desenvolvida a partir do ano 2000, como uma tentativa de melhorar a estabilidade em meio fisiológico deste tipo de moléculas.³⁵

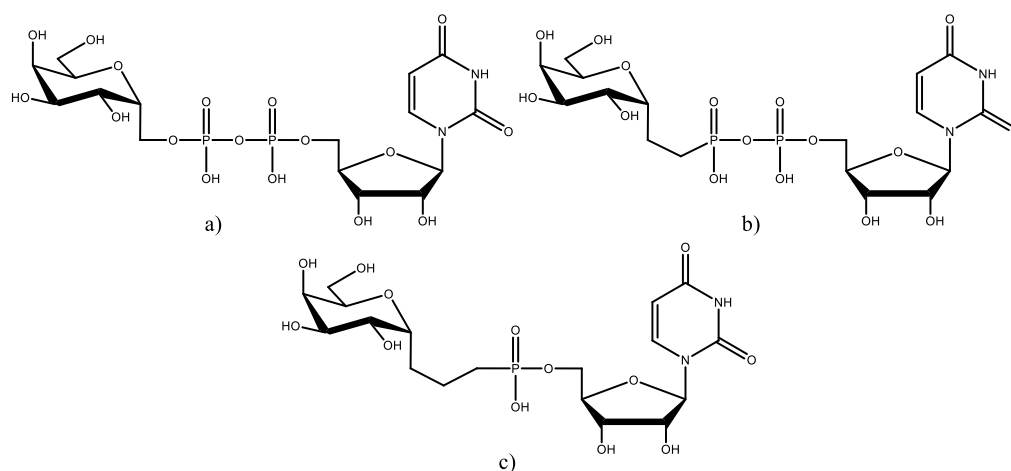


Figura 1.13 - Estruturas de análogos da UDP-Gal contendo unidades C-glicosil alquílicas como miméticos do grupo difosfato. Dentro deste tipo de compostos foram desenvolvidos: a) compostos C-glicosil metílicos³⁵; b) compostos C-glicosil etílicos⁴⁴; e c) compostos C-glicosil propílicos.⁴⁵

Um outro tipo de análogos estudados possui um aminoácido como mimético do complexo metal-difosfato (Figura 1.14).³⁶

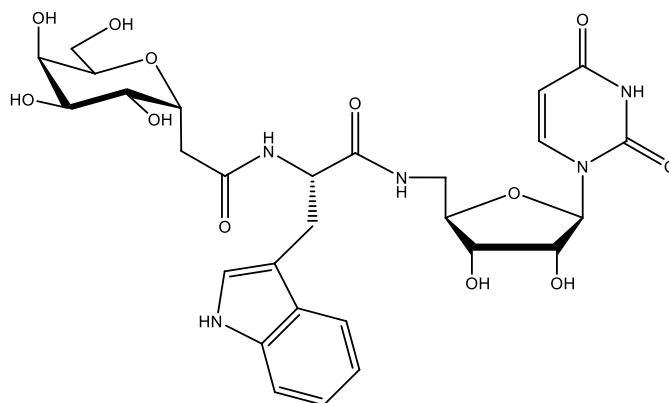


Figura 1.14 - Estrutura de um análogo da UDP-Gal contendo um aminoácido (Tryptofano) como mimético do complexo metal-difosfato.

Um outro tipo de análogos reportado na literatura são os análogos que contêm um anel de piridina entre o fragmento nucleósido e a unidade monossacáridica (Figura 1.15a). Este tipo de análogos foi estudado extensivamente, ligando à unidade de piridina outros motivos estruturais, tais como hidroximetileno (Figura 1.15b), amidas (Figura 1.15b-d) e 1,4-triazóis (Figura 1.15c,d).^{46,47}

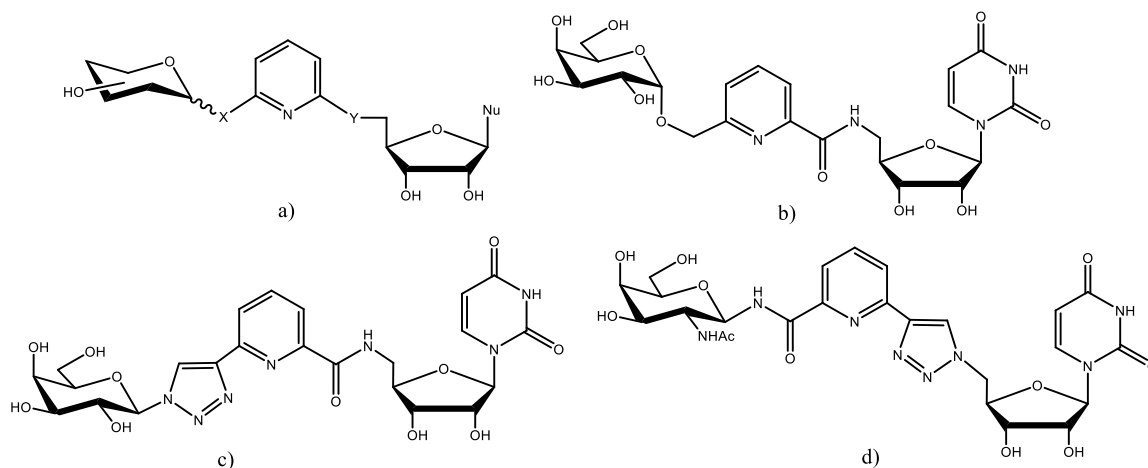


Figura 1.15 - Estruturas de análogos contendo piridina: (a) Estrutura simplificada deste tipo de análogos; (b) Estrutura de um análogo de UDP-Gal em que X=OCH₂ e Y=CONH; (c) Estrutura de um análogo da UDP-Gal em que X=1,4-Triazole e Y=CONH; (d) Estrutura de um análogo da UDP-GalNAc em que X=CONH e Y=1,4-Triazole.

Um outro tipo de análogo descrito na literatura contém um grupo oxicarbonilaminosulfonilo como mimético do grupo difosfato (Figura 1.16).³⁸

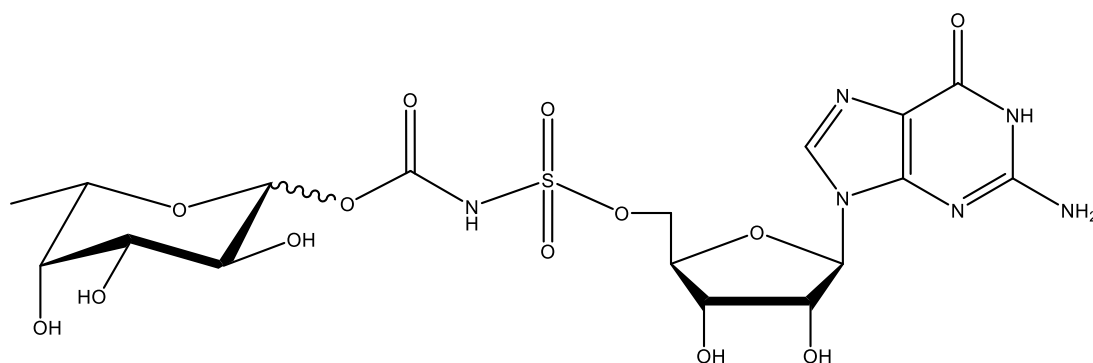
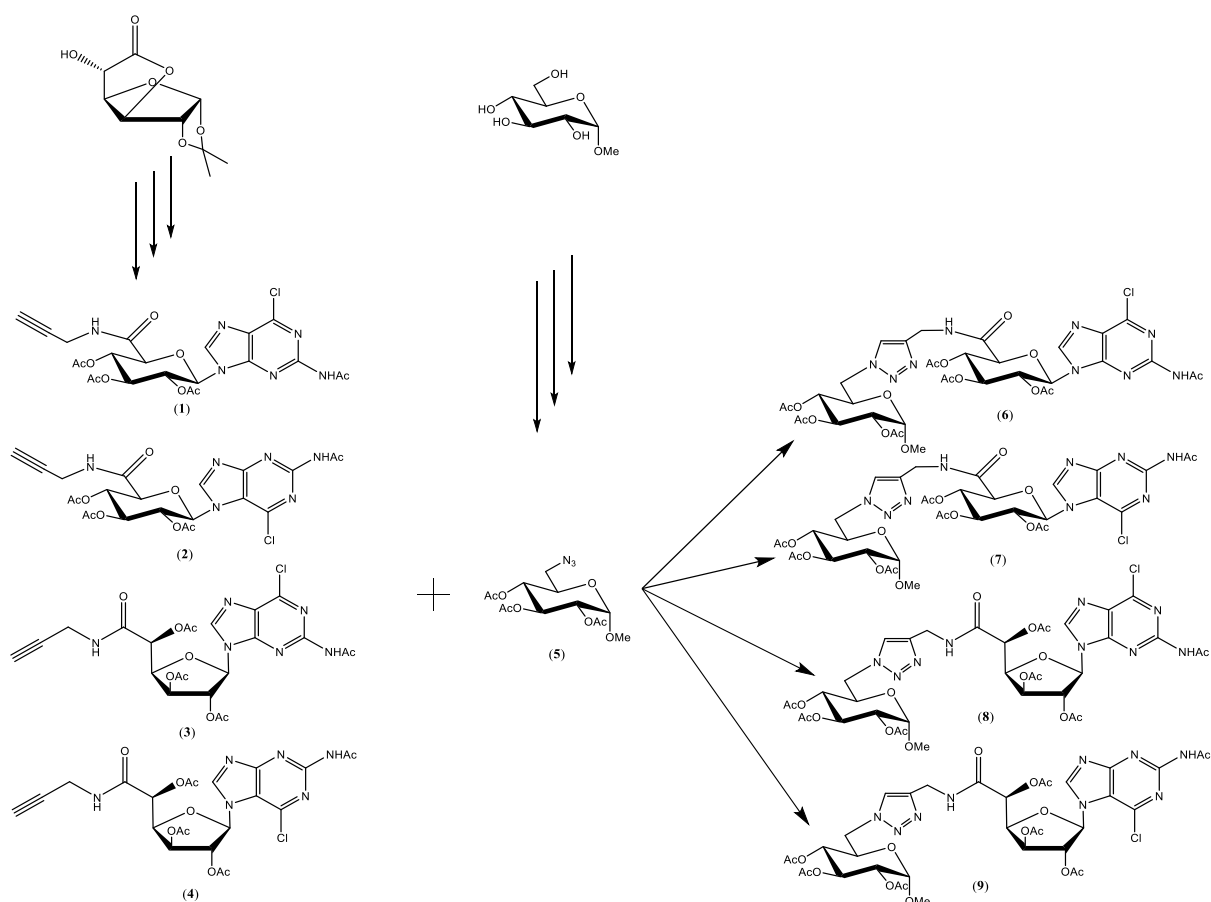


Figura 1.16 - Estrutura de um análogo da ADP-Fuc contendo um grupo *N*-sulfonil carbamato.

Capítulo 2 – Apresentação e Discussão de Resultados

2.1 Descrição Geral da Síntese

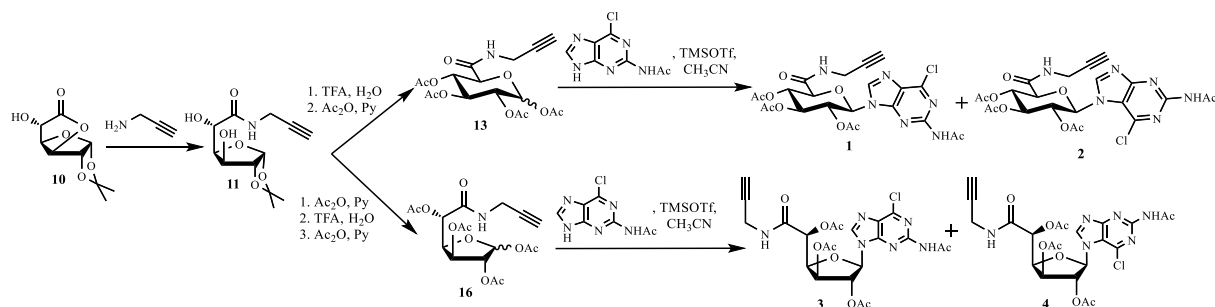
Nesta dissertação foram desenvolvidos quatro análogos de açúcares de nucleósido difosfato, numerados de **6** a **9**, numa abordagem convergente, isto é, foram sintetizados em primeiro lugar dois tipos de precursores: um análogo de nucleósido (**1-4**) e um derivado do 6-azido glucósido de metilo (**5**), sendo que depois cada um dos análogos de nucleósido foi acoplado com o derivado glicosídico, originando os análogos de açúcares de nucleósido difosfato (Esquema 2.1). O racional por detrás desta síntese já foi descrito anteriormente pelo nosso grupo.^{9,48}



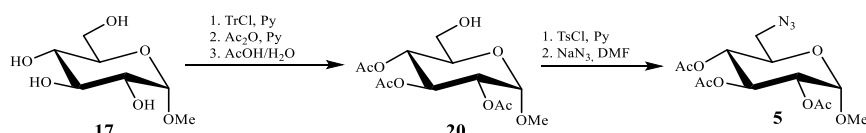
Esquema 2.1 - Descrição geral da síntese dos compostos **6** a **9**.

2.2 Síntese dos Precursores de Nucleósido (**1**) a (**4**), e do 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

A síntese dos precursores de nucleósido (**1**) a (**4**) e do precursor 6-Azido glucósido de metilo (**5**), foi realizada de forma análoga à já descrita na literatura⁹ e no nosso grupo⁴⁸ (Esquema 2.2 e Esquema 2.3).



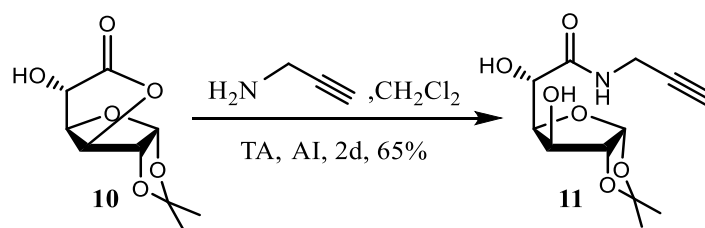
Esquema 2.2 - Esquema geral da síntese dos precursores de nucleósido (1) a (4).



Esquema 2.3 - Esquema geral da síntese do precursor 6-Azido glucósido de metilo (5).

2.2.1 Síntese dos Precursores de Nucleósido (1-4)

A síntese dos precursores de nucleósido inicia-se com a abertura de 1,2-O-isopropilideno-glucorono- γ -lactona **10** com propargilamina, em CH_2Cl_2 , à temperatura ambiente e atmosfera inerte, durante dois dias (Esquema 2.4).


 Esquema 2.4 - Esquema reacional da reação de abertura da 1,2-isopropilideno- γ -glucofuranurolactona **10**.

Após 48 horas de reação, verificou-se o progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt : n -Hex), revelando a existência de uma mancha intensa com um fator de retenção (R_f) mais baixo que o do composto inicial.

Após o fim da reação e evaporação do solvente, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 4:1 (AcOEt :Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 2:1 (AcOEt : n -Hex). No final da eluição da coluna, foi apenas recolhida uma fração, correspondente ao composto **11**.

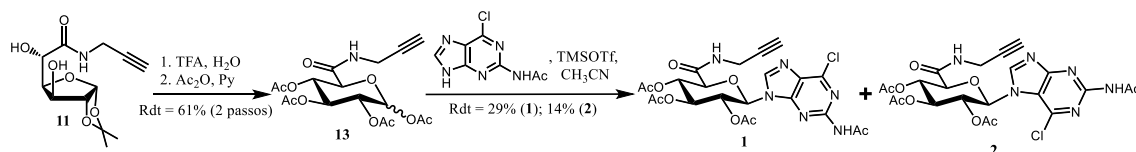
O rendimento da reação foi de 65%.

Após o fim desta reação existe uma divergência na síntese, em que, dependendo do tipo de precursor pretendido, se pode proceder de duas vias diferentes, descritas em 2.2.1.1 e 2.2.1.2.

2.2.1.1 Síntese dos Precursores de Piranosilo (1) e (2)

Partindo da *N*-propargil-1,2-O-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11**, a síntese dos nucleósidos de piranosilo **1** e **2** envolveu inicialmente a remoção do grupo di-*O*-isopropilideno presente nas posições 1 e 2, seguindo-se uma acetilação destas duas últimas posições, originando o composto **13**, como uma mistura de anomeros (razão $\alpha/\beta = 1:1$).

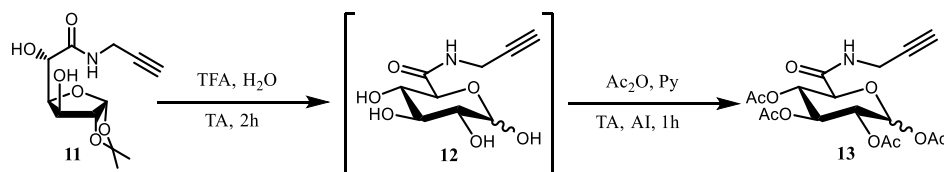
Após a obtenção do composto **13**, procedeu-se ao acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina, previamente sililada com *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) e triflato de trimetilsililo (TMSOTf) em acetonitrilo, originando os compostos **1** e **2** pretendidos. Esta via sintética encontra-se representada no Esquema 2.5.



Esquema 2.5 - Esquema geral da síntese dos nucleósidos de piranosilo precursores **1** e **2**, a partir da *N*-propargil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucufuranuronamida **11**.

Seguidamente, cada um dos passos representados no Esquema 2.11 vão ser descritos de forma detalhada.

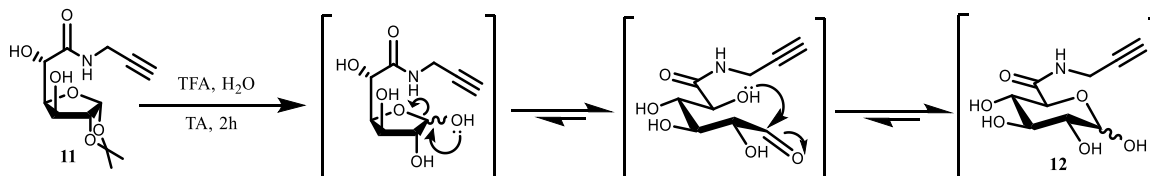
A remoção do grupo di-*O*-isopropilideno da *N*-propargil 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucufuranuronamida **11** foi realizada usando uma solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA), a temperatura ambiente, durante duas horas (Esquema 2.6).



Esquema 2.6 - Esquema reacional da síntese da *N*-propargil-1,2,3,4-tetra-*O*-acetil-D-glucopiruranonamida **13**, incluindo o composto intermediário **12**.

Após duas horas de reação, foi feita uma verificação do progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt: *n*-Hex), em que se verificou que a reação foi quase completa, existindo uma mancha intensa com um R_f mais baixo que o do composto inicial, e uma mancha ténue correspondente ao remanescente do composto **11**. Após o fim da reação procedeu-se à evaporação do solvente.

Na reação de hidrólise do grupo 1,2-*O*-isopropilideno do composto **11** existe a conversão do derivado de *N*-propargil glucuronamida contendo um anel de furanose num isómero contendo um anel de piranose. Esta isomerização decorre do equilíbrio entre a forma fechada e aberta, sendo que nesta última, o grupo hidroxilo na posição 5 também pode atacar o carbono do grupo formílico (C-1), levando à ciclização na forma de piranose (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 - Esquema ilustrativo do mecanismo de formação do intermediário **12**.

A acetilação de *N*-propargil- α,β -D-glucopiruranonamida **12** foi realizada seguidamente, sem recurso a purificação intermédia, usando anidrido acético e piridina, à temperatura ambiente, e em atmosfera inerte durante uma hora (Esquema 2.6).

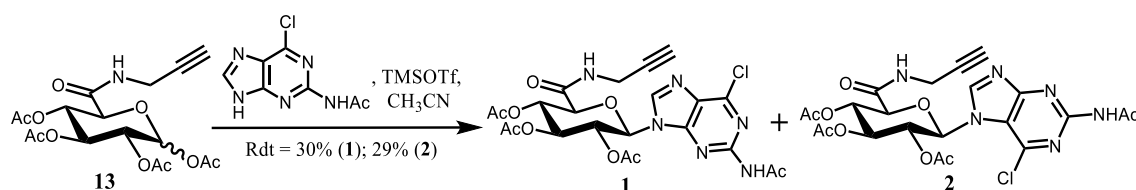
Após uma hora de reação, foi verificado o progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt:*n*-Hex), em que se verificou que a reação foi completa, existindo uma mancha intensa com R_f mais elevado que o do composto inicial, sem indícios da existência de composto inicial por reagir.

Após o fim da reação, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 2:1 (AcOEt:Et. Pet.). No final da eluição da coluna, foi recolhida uma fração importante, correspondente à mistura de anômeros α e β de *N*-propargil-1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiruranamida (**13**). Após a análise por RMN, verificou-se que o rácio α/β entre os dois anômeros era de 1:1.

A diferenciação entre os anômeros α/β procede-se por análise dos valores de *J* dos sinais do carbono anomérico. No caso de um anômero α , o valor de *J* é baixo (cerca de 3 a 4 Hz), devido à relação equatorial-axial entre H-1 e H-2. No caso de um anômero β , o valor de *J* é elevado (cerca de 8-10 Hz), devido à relação *trans*-di-axial entre H-1 e H-2.

O rendimento final destes dois últimos passos reacionais foi de 61%.

Após a obtenção do composto **16**, procedeu-se ao acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina, previamente sililada com BSA, num sintetizador micro-ondas à potência de 150 W, a uma pressão de 250 psi; e a uma temperatura de 65 °C, e na presença de TMSOTf, como ácido de Lewis em CH₃CN, durante uma hora (Esquema 2.13).



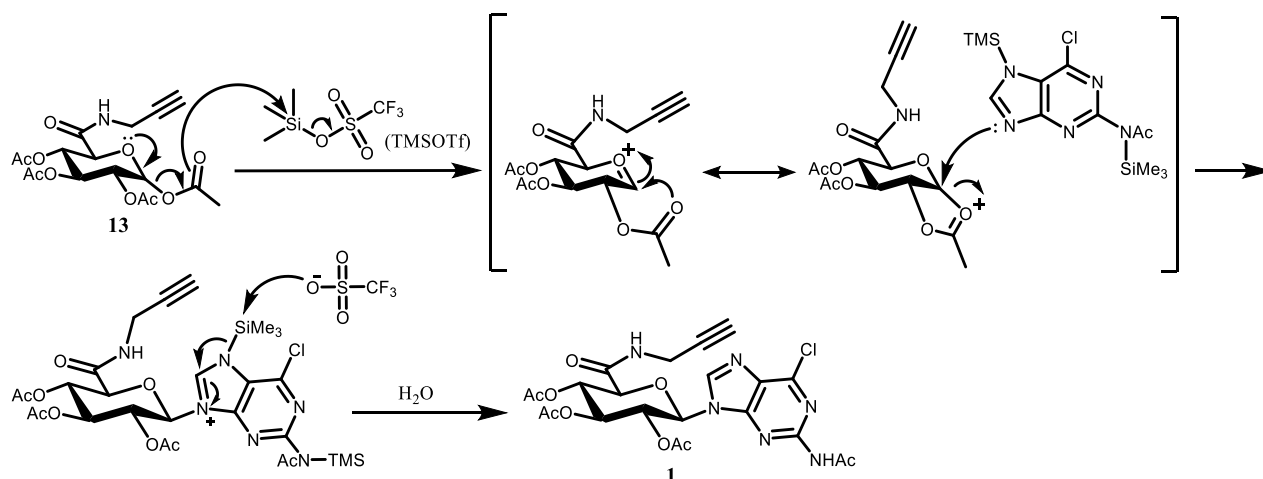
Esquema 2.8 - Esquema reacional da reação de acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina ao composto *N*-propargil-1,2,3,4-tetra-O-acetil-D-glucopiruranamida **13**.

Ao fim de uma hora de reação, foi feita uma verificação do progresso da reação, por TLC, usando um eluente 1:1 (AcOEt:n-Hex), em que se verificou que a reação foi quase completa, existindo duas manchas intensas com R_f mais baixo que o do composto inicial, e de uma mancha ténue correspondente ao remanescente do composto **13**.

Após a verificação por TLC, foi realizada uma extração líquido-líquido usando uma solução saturada de NaHCO₃. Após a recolha das fases orgânicas e consequente evaporação do solvente, obteve-se uma mistura dos compostos **1** e **2**.

Após a extração, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente com um gradiente entre 3:1 (AcOEt:Et. Pet.) e 7:1 (AcOEt:Et. Pet.), sendo a eluição das TLC realizada com um eluente 8:1 (AcOEt:CyHex). No final da eluição da coluna, foram recolhidas 2 frações importantes, correspondentes ao composto **1** e ao composto **2** nas suas formas isoladas.

Na reação de N-glicosilação do composto **13** existe a formação de uma ligação N-glicosídica entre um acetato de glicosilo e a 2-acetamido-6-cloropurina. Para isso, o uso de um agente sililante como o BSA torna a base azotada mais nucleofílica e solúvel em solventes orgânicos, potenciando a sua reatividade na reação. O uso de TMSOTf, como ácido de Lewis, tem a ação de ativar a posição anomérica do dador de glicosilo, para que o ataque nucleofílico da base azotada sililada seja mais eficaz. O controlo da estereoquímica anomérica é feito com a ajuda do efeito do grupo vizinho, fazendo com que o ataque nucleofílico da base azotada sobre o ião oxycarbénio intermediário seja apenas feito por um dos lados (Esquema 2.9).

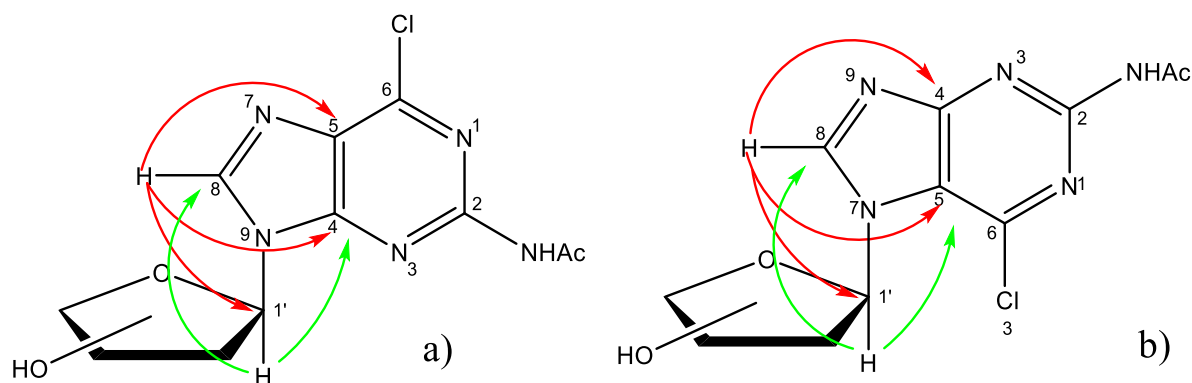


Esquema 2.9 - Esquema representativo do mecanismo da reação de N-glicosilação, usando como dador de glicosilo um derivado peracetilado e uma base azotada sililada previamente. É de notar que o mecanismo apresentado apenas ilustra a formação do isómero N⁹. No caso do isómero N⁷, a posição sililada é a N⁹.

A análise de ¹H-RMN e ¹³C-RMN dos compostos **1** e **2** foi realizada por comparação com a caracterização presente na literatura ⁹, verificando-se uma sobreposição dos sinais, levando a concluir a existência destes compostos.

A distinção entre purinas N₉- e N₇-glicosiladas, prende-se com a presença de correlações em HMBC, envolvendo H-8; H-1'; C-4 e C-5, e os desvios químicos de C-4 e C-5. A intersecção das correlações de HMBC de H-8, que correlaciona com C-1'; C-4 e C-5, e as correlações de H-1', que correlaciona com H-8 e apenas um dos dois outros sinais de ¹³C. No caso de purinas N₉-glicosiladas, o sinal de ¹³C com que correlaciona é o C-4. No caso de purinas N₇-glicosiladas, o sinal de ¹³C com que correlaciona é o C-5 (Esquema 2.10).

Sabe-se que ainda os desvios químicos de C-4 e C-5, em derivados de purinas 2, 6 e 7/9 tri-substituídas, diferem entre eles em cerca de 20-30 ppm, sendo que C-4 e C-5, por norma, tendem a possuir um desvio químico perto de 150 ppm e 120 ppm, respetivamente.⁴⁹



Esquema 2.10 - Representação esquemática das correlações em HMBC, entre H-8, H-1', C-4 e C-5 em purinas N₉-glicosiladas a). As correlações possíveis para H-8 encontram-se representadas a vermelho e as correlações de H-1' a verde. No caso de purinas N₇-glicosiladas, a intersecção das duas séries de correlações seria em C-5 b).

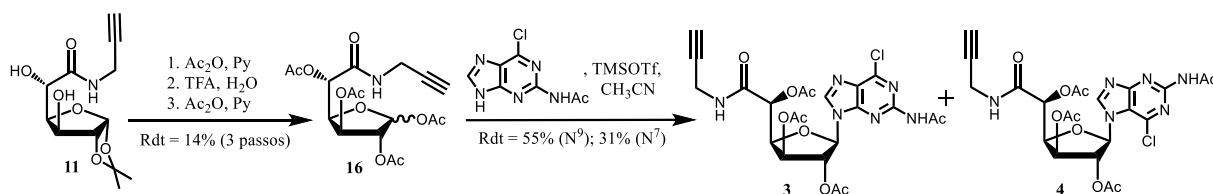
No decorrer da análise do espectro correspondente ao composto **1** verificou-se a presença de correlações entre H-8 e dois carbonos quaternários a 152,5 ppm e 128,0 ppm, correspondentes a C-4 e C-5, respetivamente. Partindo de H-1', podemos encontrar uma outra correlação com apenas o sinal a 152,5 ppm, correspondente a C-4, confirmando assim a presença do isómero N₉.

A distinção do composto **2** com o seu isómero N₉, também descrito na literatura ⁹, na impossibilidade de visualizar muitas das correlações descritas no Esquema 2.10, prende-se com a variação em desvio químico de H-8 em derivados N₇- e N₉-alquilados de purinas. Sabe-se que, por norma, o sinal de H-8 em purinas N₉-alquiladas se encontra mais blindado do que em purinas N₇-alquiladas, logo é expectável um desvio químico mais baixo de H-8 em purinas N₉-alquiladas ⁴⁹, o que se verifica neste caso.

2.2.1.2 Síntese dos Precursores de Furanosilo (**3**) e (**4**)

Partindo da *N*-propargil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11**, a síntese dos nucleósidos de furanosilo **3** e **4** envolveu uma primeira reação de acetilação dos grupos hidroxilo das posições 3 e 5, de forma a permitir a retenção do anel de furanose na reação seguinte. De seguida, procedeu-se à remoção do grupo isopropilideno presente nas posições 1 e 2. Finalmente procedeu-se à acetilação destas duas últimas posições, originando o composto **16**, como uma mistura de anómeros (razão α/β = 1:0,58).

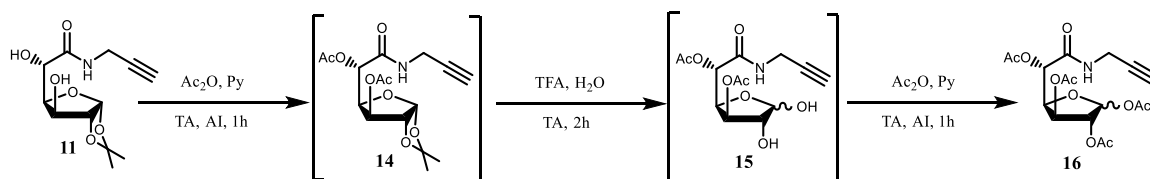
Após a obtenção do composto **16**, procedeu-se ao acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina, previamente sililada com BSA, originando os compostos **3** e **4** pretendidos. Esta via sintética encontra-se representada no Esquema 2.11.



Esquema 2.11 - Esquema geral da síntese dos nucleósidos de furanosilo precursores a partir da *N*-propargil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11**.

Seguidamente, cada um dos passos representados no Esquema 2.11 vão ser descritos de forma detalhada.

A acetilação de *N*-propargil 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11** foi realizada usando anidrido acético e piridina, à temperatura ambiente durante uma hora (Esquema 2.12).



Esquema 2.12 - Esquema reacional da síntese da *N*-propargil-1,2,3,5-tetra-*O*-acetil-D-glucofuranuronamida **16**, incluindo os compostos intermediários **14** e **15**.

Após uma hora de reação, foi feita uma verificação do progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt:Et. Pet), em que se verificou que a reação foi completa, existindo uma mancha intensa com um R_f mais elevado que o do composto inicial, não existindo qualquer indicação da existência de produto inicial na mistura reacional.

Após a reação de acetilação das posições 3 e 5 procedeu-se, sem purificação intermédia, à remoção do grupo isopropilideno em C-1 e C-2 de *N*-propargil-3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida (**14**), usando uma solução aquosa de ácido trifluoroacético, à temperatura ambiente, durante duas horas (Esquema 2.12).

Ao fim de duas horas de reação foi feita uma verificação do progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt:Et. Pet.), em que se verificou que a existência de uma mancha intensa com um R_f mais baixo que o do composto inicial, não existindo evidência da presença do composto inicial. Após o fim da reação procedeu-se à evaporação do solvente.

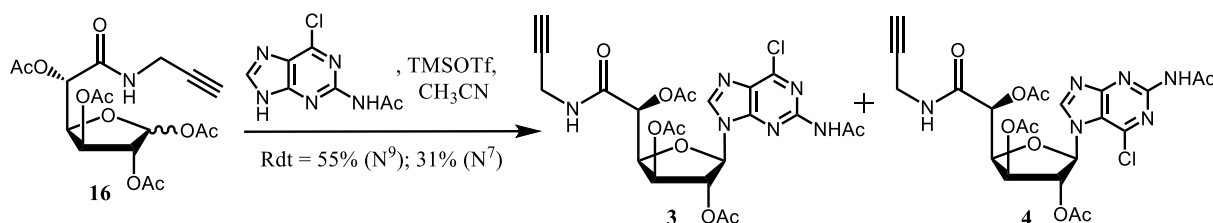
A acetilação de *N*-propargil-3,5-di-*O*-acetil-D-glucofuranuronamida (**15**) foi realizada, sem recurso a purificação, usando anidrido acético e piridina, à temperatura ambiente, e em atmosfera inerte durante uma hora (Esquema 2.12).

Ao fim de uma hora de reação, foi verificado o progresso da reação, por TLC, usando um eluente 2:1 (AcOEt:Et. Pet.), em que se verificou que a reação foi quase completa, existindo duas manchas intensas com R_f mais elevados que o do composto inicial, existindo ainda uma mancha ténue ao R_f do composto inicial.

Após o fim da reação, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 2:1 (AcOEt:Et. Pet.). No final da eluição da coluna, foi recolhida uma fração importante, correspondente à mistura de anómeros α e β da *N*-propargil-1,2,3,5-tetra-*O*-acetilglucofuranuronamida (**16**). Após a análise por RMN, verificou-se que a razão α/β entre os dois anómeros era de 1:0,58, identificados de forma análoga à usada para os anómeros de **13**.

O rendimento final destes três últimos passos reacionais foi de 14%.

Após a obtenção do composto **16**, procedeu-se ao acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina, previamente sililada com BSA. A reação foi realizada num sintetizador micro-ondas à potência usada de 150 W, a uma pressão de 250 psi; e a uma temperatura de 65 °C, usando TMSOTf, como ácido de Lewis, em CH₃CN, durante uma hora (Esquema 2.13).



Esquema 2.13 - Esquema reacional da reação de acoplamento da 2-acetamido-6-cloropurina ao composto *N*-propargil-1,2,3,5-tetra-*O*-acetil-glucofuranuronamida (**16**).

Ao fim de uma hora de reação, foi feita uma verificação do progresso da reação, por TLC, usando um eluente 1:1 (AcOEt:n-Hex), em que se verificou que a reação foi quase completa, existindo duas manchas intensas com R_f mais baixo que o do composto inicial, e de uma mancha ténue correspondente ao remanescente do composto **16**.

Após a verificação por TLC, foi realizada uma extração líquido-líquido usando uma solução saturada de NaHCO₃. Após a recolha das fases orgânicas e consequente evaporação do solvente, obteve-se uma mistura dos compostos **3** e **4**.

Após a extração, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente com gradiente entre 4:1 (AcOEt:CyHex) e 5:1 (AcOEt:CyHex), sendo a eluição das TLC realizada com um eluente 8:1 (AcOEt:CyHex). No final da eluição da coluna, foram recolhidas 2 frações importantes, correspondentes ao composto **3** e ao composto **4** nas suas formas isoladas.

A análise de ¹H-RMN dos compostos **3** e **4** inicia-se com a atribuição dos sinais referentes ao próton H-8, o próton que possui o maior desvio químico. Segue-se a atribuição de H-1', um duplete com

J pequeno (de 0 a 2,0 Hz) e um desvio químico elevado, tornando-o distintivo. Por COSY, foi então possível a atribuição de H-2', um outro duplete com J baixo. A atribuição de H-3', um duplete com um desvio químico ligeiramente superior a H-2', foi possível através das correlações presentes no HMBC, entre H-2' e C-3'. Com a atribuição de H-3', foi possível a atribuição de H-4' e H-5', com recurso ao COSY.

A atribuição de H-7'a/H-7'b é realizada por exclusão, pois é o sinal de próton restante com desvio químico na gama correspondente a prótons de monossacáridos. A partir de H-7' é possível a atribuição do sinal correspondente ao próton do grupo amida em C-6. A atribuição de H-9' é possível pela correlação de HMBC entre H-7' e C-9'. A atribuição dos restantes singletos, referentes aos grupos acetilo, foi possível com o recurso a correlações de HMBC entre estes sinais e sinais de ^{13}C presentes a cerca de 170 ppm. A atribuição dos restantes sinais de ^{13}C -RMN foi feita com o recurso a HSQC.

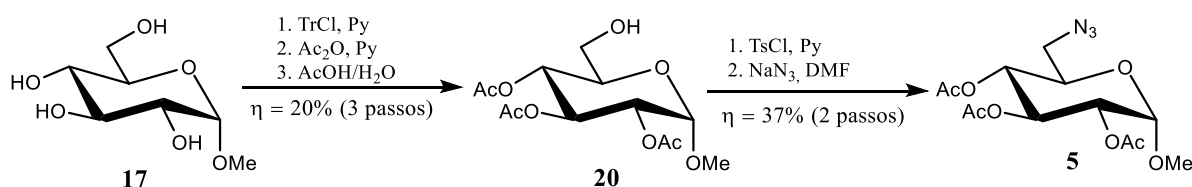
No decorrer da análise do espectro correspondente ao composto **3** verificou-se a presença de correlações entre H-8 e dois carbonos quaternários a 152,5 ppm e 128,0 ppm, correspondentes a C-4 e C-5, respetivamente. Partindo de H-1', podemos encontrar uma outra correlação com apenas o sinal a 152,5 ppm, correspondente a C-4, confirmando assim a presença do isómero N₉.

A distinção do composto **4** com o seu isómero N₉, também descrito na literatura ⁹, na impossibilidade de visualizar muitas das correlações descritas no Esquema 2.10, prende-se com a variação em desvio químico de H-8 em derivados N₇- e N₉-alquilados de purinas. Sabe-se que, por norma, o sinal de H-8 em purinas N₉-alquiladas se encontra mais blindado do que em purinas N₇-alquiladas, logo é expectável um desvio químico mais elevado de H-8 em purinas N⁷-alquiladas, o que se verifica neste caso.

2.2.2 Síntese do Precursor 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

Partindo do α -D-glucósido de metilo **17**, procedeu-se à proteção seletiva da posição 6, usando um grupo tritilo, à acetilação das restantes posições livres e, por fim, à remoção do grupo tritilo em meio ácido, originando o composto **20** com um rendimento total de 20%. Após a obtenção do 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucósido de metilo **20**, procedeu-se à introdução do grupo azida na posição 6, via tosilação, de forma a criar um bom grupo rejeitado, seguida de substituição nucleofílica com ião azida. O composto 6-azido-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucósido de metilo **5** foi então obtido com um rendimento de 37%.

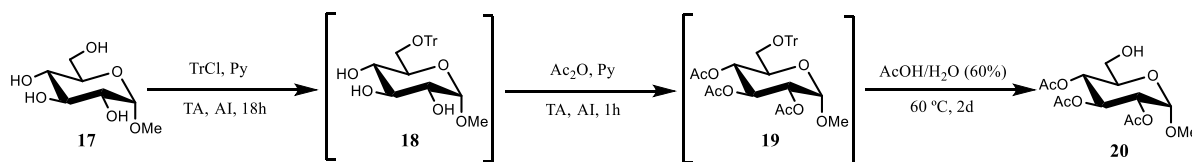
Esta via sintética encontra-se representada no Esquema 2.14.



Esquema 2.14 - Esquema geral da síntese do 6-Azido-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucósido de metilo **5**, a partir do α -D-glucósido de metilo **17**.

Seguidamente, cada um dos passos representados no Esquema 2.14 vão ser descritos de forma detalhada.

A proteção da posição 6 do α -D-glucósido de metilo **17**, com recurso a um grupo tritilo foi realizada usando cloreto de tritilo e piridina, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 18 horas (Esquema 2.15).



Esquema 2.15 - Esquema reacional da síntese do 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucósido de metilo **20**, incluindo os compostos intermediários **18** e **19**.

Após dezoito horas de reação, foi realizada uma verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente AcOEt, em que se verificou a conversão quase completa do produto de partida, existindo uma mancha intensa com um R_f mais elevado que o do composto inicial, existindo apenas uma mancha ténue com um R_f correspondente do produto inicial.

Após a obtenção do 6-O-tritil- α -D-glucósido de metilo **18**, procedeu-se à acetilação das restantes posições livres, usando anidrido acético e piridina, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante uma hora (Esquema 2.15).

Após uma hora de reação, verificou-se por TLC, usando um eluente AcOEt, a conversão completa do produto de partida, existindo apenas uma mancha com R_f mais elevado que o do composto de partida.

Após a verificação da conversão completa do composto de partida, procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo.

Após a acetilação das posições livres do 6-O-tritil- α -D-glucósido de metilo **18**, procedeu-se à remoção do grupo tritilo presente na posição 6, usando uma solução aquosa de ácido acético a 60%, à temperatura de 60 °C, durante dois dias (Esquema 2.15).

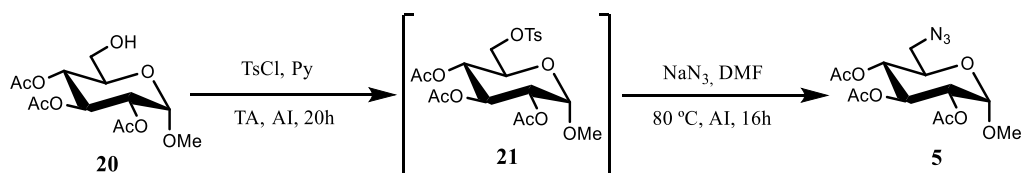
Ao fim de dois dias de reação, procedeu-se à verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), verificando-se a conversão quase completa do produto de partida **19**, tendo sido dada por completa a reação.

Após da reação ter sido dada por completa, procedeu-se à evaporação do solvente. Após o fim da reação, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 1:3 (AcOEt:Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 1:2 (AcOEt:Et. Pet.). No final da eluição da coluna, foi recolhida uma fração importante correspondente ao 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosídeo de metilo **20**.

A análise de ^1H -RMN do composto **20** inicia-se com a atribuição do sinal referente ao protão H-1, o único duplete presente no espetro. Após a atribuição de H-1, a atribuição de H-2 a H-6 torna-se possível, com recurso ao COSY. A atribuição dos restantes singletos, referentes aos grupos acetilo e ao grupo OMe, foi possível com o recurso a correlações de HMBC entre estes sinais e sinais de ^{13}C presentes a cerca de 170 ppm, no caso dos grupos acetilo, e com o sinal referente a C-1, no caso do grupo OMe. A atribuição dos restantes sinais de ^{13}C -RMN foi feita com o recurso a HSQC.

O rendimento final destes três últimos passos reacionais foi de 20%.

Com a obtenção do 2,3,4-tri-O-acetil- α -D-glucopiranosídeo de metilo **20**, procedeu-se a uma nova proteção da posição 6 com um grupo tosilo. Esta proteção é possível usando cloreto de tosilo (TsCl) em piridina, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante dezasseis horas (Esquema 2.16).



Esquema 2.16 - Esquema reacional da síntese do 6-azido-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucósido de metilo **5**, a partir do 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucósido de metilo **20**, incluindo o intermediário **21**.

Ao fim de dezasseis horas de reação, procedeu-se à verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), verificando-se a conversão quase completa do produto de partida (**20**), com o aparecimento de uma mancha com R_f superior ao do produto de partida.

Após esta verificação do progresso da reação, foram adicionados 0,5 eq. de TsCl, e a reação deixada a reagir durante mais quatro horas. Ao fim das quatro horas de reação, foi novamente verificado o progresso da reação, usando um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), tendo sido dada por completa. De seguida procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo.

Após a evaporação do solvente, foi realizada uma pequena coluna de purificação com um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.). No final da eluição da coluna, foi recolhida uma fração importante correspondente ao 6-*O*-tosil-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido de metilo **21**.

Com a obtenção de 6-*O*-tosil-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido de metilo **21**, passou-se á introdução do grupo azida na posição 6, numa reação do tipo S_N2 , usando azida de sódio (NaN_3) em *N,N*-dimetilformamida (DMF), à temperatura de 80° C, atmosfera inerte e durante dezasseis horas.

Ao fim de dezasseis horas de reação, procedeu-se à verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente 1:1 (AcOEt:Et. Pet.), verificando-se a conversão quase completa do produto de partida (**21**), com o aparecimento de uma mancha com R_f superior ao do produto de partida. De seguida procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo.

Após a evaporação do solvente, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 1:3 (AcOEt:Et. Pet.), havendo a eluição das TLC num eluente 1:2 (AcOEt:Et. Pet.). No final da eluição da coluna, foi recolhida uma fração importante correspondente ao 6-azido-2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucopiranosido de metilo **5**.

A análise do espetro do composto **5** é bastante semelhante à análise do espetro do composto **20**, existindo apenas alterações em desvios químicos dos sinais de ^1H e ^{13}C , em especial dos que se encontram perto do grupo azida. No caso dos prótons H-6a, H-6b, estes encontram-se a um desvio químico menor no caso do azido açúcar **5** (*i.e.* num multipeto entre 3,38-3,28 ppm) em comparação com o derivado hidroxilado **20**, no qual estes prótons aparecem a 3,72 ppm, 3,61 ppm. No caso do valor de desvio químico do sinal do carbono correspondente (C-6), esta observação também se verifica, sendo este menor para **5** ($\delta = 50,9$ ppm) do que no caso do derivado hidroxilado **20** ($\delta = 60,9$ ppm).

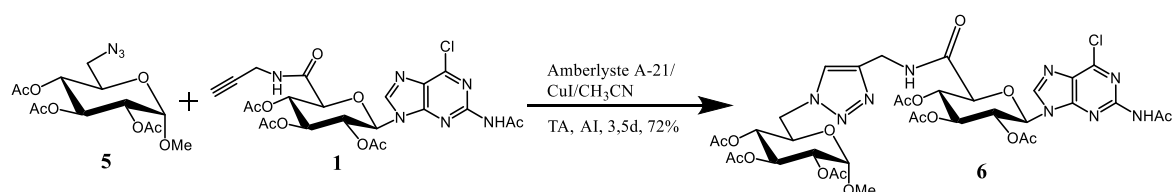
O rendimento final destes dois últimos passos reacionais foi de 37%.

2.3 Acoplamento dos Precursores (1) a (4) ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5)

Para o acoplamento dos dois precursores anteriormente sintetizados, recorreu-se a uma reação de cicloadição 1,3-dipolar, inicialmente descrita por Huisgen em 1963. Com esta reação é possível a síntese de triazoles-1,4 e 1,5 substituídos por um mecanismo concertado envolvendo o grupo alquinilo e o grupo azida.^{50,51} Em 2001, Sharpless introduz o conceito de reação “click-chemistry”, como sendo uma reação rápida, usando um protocolo simples, tendo alto rendimento e com aplicação abrangente, em que se obtém o produto com regio- e/ou estereoseletividade.⁵² Em 2006, foi reportado que a utilização de sais de Cu (I) como espécie catalítica, permite a formação apenas de triazoles-1,4 substituídos em condições reacionais suaves seguida de um método simples de purificação, tornando-se assim um dos protótipos de uma reação “click-chemistry”.⁵³ De facto, este método é tão eficaz que a terminologia “click-chemistry” lhe é geralmente associada.

2.3.1 Acoplamento do Composto 1 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5)

O acoplamento entre os precursores **1** e **5** foi realizado usando Amberlyste A-21/CuI em CH₃CN, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 88 horas (cerca de 3,5 dias) (Esquema 2.17).



Esquema 2.17 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos **1** e **5**.

Após cerca de 3,5 dias de reação, foi realizada uma verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente AcOEt, em que se verificou a presença de uma mancha intensa com um R_f mais baixo que os dos compostos iniciais, com conversão de grande maioria do reagente limitante (Figura 2.1).

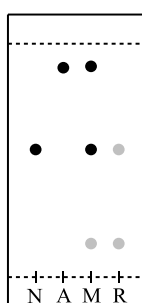


Figura 2.1 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos **1** e **5** (N: Nucleósido (**1**); A: Azida (**5**); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt).

Após o fim da reação e a filtração do catalisador, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 9:1 (AcOEt:MeOH), havendo a eluição das TLC num eluente 9:1 (AcOEt:MeOH). No final da eluição da coluna, foram recolhidas duas frações importantes, sendo a primeira correspondente ao remanescente do composto **1**, e a segunda ao composto **6**.

O rendimento da reação foi de 72%.

2.3.1.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto **6**

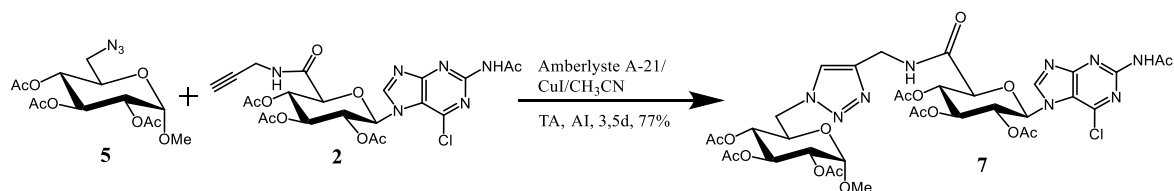
A análise de ^1H -RMN do composto **6** inicia-se com a atribuição dos sinais referentes aos prótons H-8 e H-9', os prótons com maior desvio químico, sendo que a distinção entre estes é feita através do desvio químico do sinal de carbono associado por HSQC, em que o desvio químico de C-8 é o mais elevado, excluindo carbonos quaternários. Depois, passou-se à atribuição de H-1', um duplete que aparece a um desvio químico elevado com J elevado, devido à relação *trans*-di-axial entre este próton e H-2'. Por COSY, a atribuição de H-2', H-3' e H-4' foi possível com relativa facilidade. O sinal de H-4' encontra-se parcialmente sobreposto com o sinal de H-3'', que foi atribuído através das correlações de H-4'' e H-5''. O sinal de H-5'' aparece com multiplicidade ddd, tornando-o assim distintivo. Feita a atribuição de H-3'', a atribuição de H-2'' e H-1'' foi realizada com recurso a COSY.

A atribuição dos restantes singletos foi realizada com recurso a correlações de HMBC com os respetivos sinais de ^{13}C -RMN presentes a cerca de 20 ppm, no caso dos sinais referentes aos grupos acetilo, e a C-1'', no caso do grupo OMe. A atribuição dos sinais de ^{13}C -RMN foi feita com o recurso a HSQC e, em certos casos, a HMBC, devido à baixa intensidade de algumas correlações de HSQC.

A distinção deste composto com o seu isómero N₇, já descrito na literatura ⁹, na impossibilidade de visualizar muitas das correlações descritas em 2.3.3.1, prende-se com a variação em desvio químico de H-8 em derivados N₇- e N₉-alquilados de purinas. Sabe-se que, por norma, H-8 em purinas N₉-alquiladas em se encontra mais blindado que em purinas N₇-alquiladas, logo é expectável um desvio químico mais baixo de H-8 em purinas N₉-alquiladas ⁴⁹, o que se verifica neste caso.

2.3.2 Acoplamento do Composto **2** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

O acoplamento entre os precursores **2** e **5** foi realizado usando Amberlyste A-21/CuI em CH₃CN, à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 88 horas (cerca de 3,5 dias) (Esquema 2.18).



Esquema 2.18 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos **2** e **5**.

Após cerca de 3,5 dias de reação foi realizada uma verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente AcOEt, na qual se verificou a presença de uma mancha intensa com um R_f mais baixo que os dos compostos iniciais, com conversão maioritária do reagente limitante (Figura 2.2).

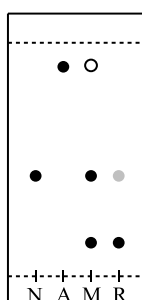


Figura 2.2 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos **2** e **5** (N: Nucleósido (**2**); A: Azida (**5**); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt)

Após o fim da reação e a filtração do catalisador, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 9:1 (AcOEt:MeOH), havendo a eluição das TLC num eluente 9:1 (AcOEt:MeOH). No final da eluição da coluna, foram recolhidas duas frações importantes, sendo a primeira correspondente ao remanescente do composto **2**, e a segunda ao composto **7**.

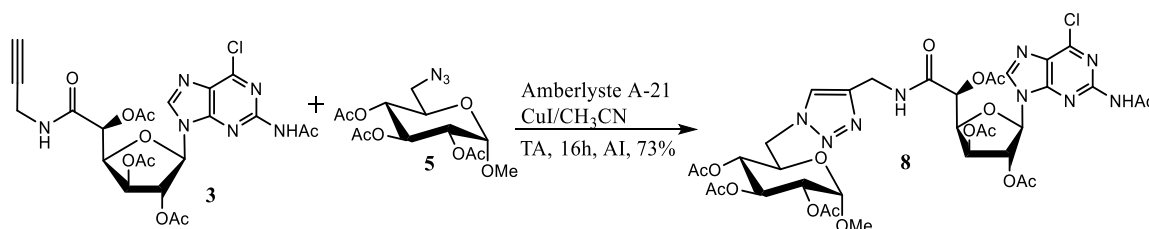
O rendimento da reação foi de 61%.

2.3.2.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto **7**

A análise de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN do composto **7** foi realizada por comparação com a caracterização presente na literatura ⁹, verificando-se uma sobreposição dos sinais, levando a concluir a existência do composto **7**.

2.3.3 Acoplamento do Composto **3** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

O acoplamento entre os precursores **3** e **5** foi realizado usando Amberlyste A-21/CuI em CH_3CN , à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 16 horas (Esquema 2.19).



Esquema 2.19 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos **3** e **5**.

Após 20 horas de reação, foi feita uma verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente AcOEt, em que se verificou que a reação foi completa, com conversão total do reagente limitante, neste caso, o nucleósido, existindo uma mancha intensa com um R_f mais baixo que os dos compostos iniciais (Figura 2.3).

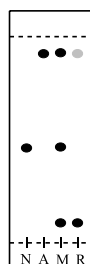


Figura 2.3 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos **3** e **5** (N: Nucleósido (**3**); A: Azida (**5**); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt).

Após o fim da reação e a filtração do catalisador, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 9:1 (AcOEt:MeOH), havendo a eluição das TLC num eluente 9:1 (AcOEt:MeOH). No final da eluição da coluna, foi apenas recolhida uma fração importante, correspondente ao composto **8**.

O rendimento da reação foi de 73%.

2.3.3.1 Análise do Espectro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto **8**

A análise de ^1H -RMN do composto **8** inicia-se com a atribuição dos sinais referentes aos prótons H-8 e H-9', os prótons com maior desvio químico, sendo que a distinção entre estes é feita através do desvio químico do sinal de carbono associado por HSQC, em que o desvio químico de C-8 é o mais elevado, excluindo carbonos quaternários. Seguiu-se a atribuição do sinal referente a H-1', um duplete com *J* muito baixo, o que o torna um sinal distintivo. Por COSY, foi então possível a atribuição de H-2', um singleto alargado. A atribuição de H-3', um duplete com um desvio químico ligeiramente superior a H-2', foi possível através das correlações presentes no HMBC, entre H-2' e C-3'. Com a atribuição de H-3', foi possível a atribuição de H-4', com recurso ao COSY. A sobreposição destes sinais com sinais provenientes da outra unidade monossacarídica torna a atribuição mais complexa, pelo que a análise dos vários valores de *J* se torna essencial para a atribuição inequívoca destes sinais.

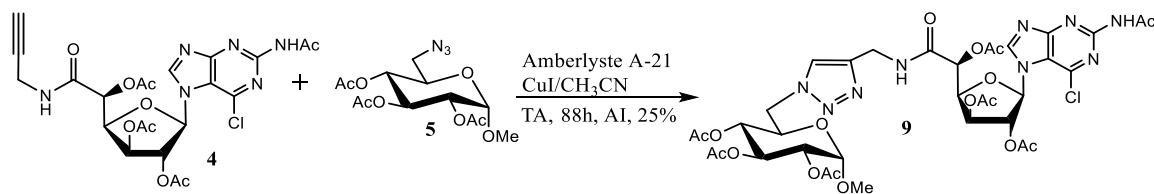
A atribuição dos sinais H-1'' a H-6'' inicia-se com a atribuição de H-5'', um sinal com multiplicidade ddd, tornando-o facilmente distinguível. Posto isto, a partir de H-5'', a atribuição dos restantes sinais dessa unidade monossacarídica torna-se mais fácil, usando COSY. É de notar que H-1'' e H-2'' se encontram sobrepostos, pois depois de atribuído H-2'', se verifica apenas a correlação com H-3'', não existindo assim a correlação com H-1''.

A atribuição de H-5' é complexa pois devido ao facto de H-4' e H-4'' se encontrarem sobrepostos, as correlações por COSY a partir destes dois sinais deveriam obter-se 4 correlações, mas só é possível a visualização de 3 correlações, levando a crer que existem dois sinais sobrepostos. Após análise do sinal correspondente a H-3'', verifica-se uma integração de 2H, confirmando a hipótese de sobreposição de sinais. A atribuição de H-7' é feita por exclusão, pois apenas existem 2 sinais em HSQC com cor azul, indicativa de carbonos metilénicos, sendo eles H-7' e H-6'', que por sua vez pode ser atribuído pela análise de COSY. A atribuição dos restantes singletos foi realizada com recurso a correlações de HMBC com os respetivos sinais de ^{13}C presentes a cerca de 20 ppm, no caso dos sinais referentes aos grupos acetilo, e a C-1'', no caso do grupo OMe. A atribuição dos sinais de ^{13}C -RMN foi feita com o recurso a HSQC.

De forma a confirmar a regioquímica da ligação N-glicosídica deste composto, foi aplicado o método descrito no Esquema 2.10. Neste composto podemos verificar correlações de H-8 com dois carbonos quaternários a 153,4 ppm e 128,9 ppm, correspondentes a C-4 e C-5, respetivamente. Partindo de H-1', podemos encontrar correlação com apenas o sinal a 153,4 ppm, correspondente a C-4, confirmando assim a presença do isómero N₉.

2.3.4 Acoplamento do Composto **4** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

O acoplamento entre os precursores **4** e **5** foi realizado usando Amberlyste A-21/CuI em CH_3CN , à temperatura ambiente e em atmosfera inerte, durante 88 horas (cerca de 3,5 dias) (Esquema 2.20).



Esquema 2.20 - Esquema reacional da reação de acoplamento entre os compostos **4** e **5**.

Passadas cerca de 88 horas realizou-se uma verificação do progresso da reação por TLC, usando um eluente AcOEt, na qual se verificou a presença de uma mancha intensa com um R_f mais baixo que os dos compostos iniciais, com conversão parcial do reagente limitante (Figura 2.4).

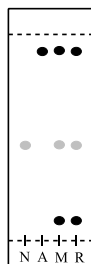


Figura 2.4 - Imagem ilustrativa da TLC da reação de acoplamento entre os compostos **4** e **5** (N: Nucleosido (**4**); A: Azida (**5**); M: Mistura N,A e R; R: Meio reacional) (Eluente: AcOEt)

Após o fim da reação e a filtração do catalisador, foi realizada uma coluna de purificação com um eluente 9:1 (AcOEt:MeOH), havendo a eluição das TLC num eluente 9:1 (AcOEt:MeOH). No final da eluição da coluna, foram recolhidas duas frações importantes, correspondentes ao composto **4** e a um produto de degradação.

O rendimento da reação foi de 25%.

2.3.4.1 Análise do Espetro de ^1H - e ^{13}C -RMN do Composto **9**

A análise de ^1H -RMN do composto **9** inicia-se com a atribuição dos sinais referentes aos prótons H-8 e H-9', os prótons com maior desvio químico, sendo que a distinção entre estes é feita através do desvio químico do sinal de carbono associado por HSQC, em que o desvio químico de C-8 é o mais elevado, excluindo carbonos quaternários. Seguiu-se a atribuição do sinal referente a H-1', um singlete alargado, produto de baixa resolução do sinal, sendo assim um sinal facilmente reconhecível. Por COSY, foi então possível a atribuição de H-2', um singlete alargado. A atribuição de H-3', um duplete com um desvio químico ligeiramente superior a H-2', foi possível através das correlações presentes em HMBC, entre H-2' e C-3'. Com a atribuição de H-3', foi possível a atribuição de H-4' e H-5', novamente com recurso ao COSY, visto que estes sinais têm a multiplicidade dd e d, respetivamente. A sobreposição destes sinais com sinais provenientes da outra unidade monossacarídica torna a atribuição mais complexa, pelo que a análise dos vários valores de J se torna essencial para a atribuição inequívoca destes sinais.

A atribuição dos sinais H-1'' a H-6'' inicia-se com a atribuição de H-5'', um sinal com multiplicidade ddd, tornando-o facilmente distinguível. Posto isto, a partir de H-5'', a atribuição dos sinais H-4'' e H-3'' torna-se mais fácil, usando COSY. É de notar que a presença de H-1'' e H-2'' se torna complexa de comprovar, já que a existência do sinal referente a H_2O com baixa resolução torna a correlação por COSY entre H-3'' e H-2'' impossível de identificar, apenas sendo possível identificar por uma correlação de HMBC entre H-3'' e C-2''. Após a identificação de H-2'', verifica-se a presença de dois sinais no espectro de HSQC na região do espectro de ^1H onde se encontra H-2'', concluindo-se que existe sobreposição parcial de H-2'' e H-1''.

A atribuição de H-7' é feita por exclusão, pois apenas existem 2 sinais em HSQC com cor azul, indicativa de carbonos metilénicos, sendo eles H-7' e H-6'', que por sua vez pode ser atribuído pela análise de COSY. A atribuição dos restantes singletos foi realizada com recurso a correlações de HSQC com os respetivos sinais de ^{13}C presentes a cerca de 20 ppm, no caso dos sinais referentes aos grupos

acetilo, e a C-1'', no caso do grupo OMe. A atribuição dos sinais de ^{13}C -RMN foi feita com o recurso a HSQC.

A distinção deste composto com o seu isómero N₉, na impossibilidade de visualizar muitas das correlações descritas no Esquema 2.10, prende-se com a variação em desvio químico de H-8 em derivados N₇- e N₉-alquilados de purinas. Sabe-se que, por norma, H-8 em purinas N₉-alquiladas em se encontra mais blindado que em purinas N₇-alquiladas, logo é expectável um desvio químico mais baixo de H-8 em purinas N₉-alquiladas ⁴⁹, o que se verifica neste caso.

2.4 Ensaios de Solubilidade com o Composto 6

Depois da síntese dos 4 compostos verificou-se que estes possuem baixa solubilidade em meio aquoso, devido em grande parte à presença de grupos acetilo como grupo protetor dos grupos hidroxilo nas duas unidades sacarídicas, o que impede o composto de interagir por ligações de hidrogénio com o meio, como seria no caso dos compostos desprotegidos.

Defrontado com esta problemática de baixa solubilidade, foram pesquisadas estratégias que possibilitassem a solubilização dos compostos. A utilização de um co-solvente foi apontada rapidamente como uma estratégia promissora, baseado em trabalhos anteriores realizados no Grupo de Glicoimunologia, em que compostos, que apresentavam igualmente baixa solubilidade em meio aquoso, conseguiram ser solubilizados com a utilização de DMSO.⁵⁴

O DMSO, um solvente orgânico miscível em água, é apontado como um bom candidato a co-solvente⁵⁵, embora possua alguma citotoxicidade, o que pode influenciar os resultados dos testes de viabilidade celular.

Na Tabela 2.1 estão representados os 4 compostos sintetizados, a sua massa molar e o logP calculado, usando o programa ChemSketch 12.0.

Tabela 2.1 - Características dos 4 compostos sintetizados quanto ao anel de nucleósido, a regioquímica da ligação N-glicosídica, a sua massa molar e LogP calculado no programa Chemschetch 12.0.

Composto	Anel Nucleósido	Ligação N-Glicosídica	Massa Molar (g/mol)	cLogP
6	Pirnose	N ₉	896,22	1,92±1,18
7	Pirnose	N ₇		
8	Furanose	N ₉		1,99±0,90
9	Furanose	N ₇		

Devido à grande semelhança, nos 4 compostos, tanto estrutural como nos valores de logP obtidos, foi escolhido apenas um dos compostos para testes de solubilidade, tendo sido escolhido o composto **6**.

O composto **6** foi escolhido como composto modelo nestes ensaios. Embora a sua pureza não fosse a ideal, pois contém o composto **7**, o seu regioisómero, como contaminante principal, a sua maior quantidade disponível permite a determinação da solubilidade sem incorrer em risco de falta de composto para os testes seguintes.

Inicialmente, foram realizados testes de solubilidade em soluções em DMSO contendo 1 mg do composto **6** a diferentes concentrações, denominadas de stock, sendo depois adicionada água destilada, até ser atingida a concentração final de 1 mM de composto **6**. Por vezes foi necessária a imersão em banho aquecido a 37 °C, de forma a potenciar a solubilização do composto. Os resultados deste teste preliminar revelam uma diminuição na solubilidade do composto **6** a 0,5% de DMSO.

Posteriormente, numa tentativa de aproximar as condições de teste às existentes nos testes de viabilidade celular, foi usado DMEM em substituição da água, sendo o procedimento análogo ao

utilizado anteriormente. Na Tabela 2.2 estão representadas as diferentes condições testadas, quer de meio usado como concentrações stock e, consequentemente, de teor em DMSO.

Tabela 2.2 - Tabela representativa dos resultados dos ensaios de solubilidade realizados à concentração de 1mM.

Concentração Stock	Solubilidade em Água	Solubilidade em DMEM	% DMSO Sol. Final
2 mM	Solúvel	Solúvel (após 2,5h a 37°C)	50
20 mM	Solúvel	Solúvel (após 2,5h a 37°C)	5
200 mM	Parcialmente insolúvel (após 1h a 37 °C)	Solúvel (após 2,5h a 37°C)	0,5
400 mM	////////////////	Insolúvel (após 0,5h a 37 °C)	0,25
300 mM	////////////////	Parcialmente insolúvel (depois de 6h a 37°C)	0,33
250 mM	////////////////	Solúvel (após 6h a 37 °C)	0,40

Como se pode verificar na Tabela 2.2, a solubilidade do composto **6** no meio de cultura DMEM tem um ligeiro aumento em comparação com os resultados obtidos usando água destilada, o que pode leva a crer que um dos componentes do meio de cultura pode ajudar a solubilização do composto. Podemos ainda concluir que a concentração limite em que o composto **6** é solúvel em DMEM se encontra na gama dos 250 mM.

Analisando globalmente os resultados representados na Tabela 2.2 chega-se à conclusão de que a concentração da solução stock útil mínima de solubilidade é de 200 mM, equivalente a 0,5% de DMSO na solução final. Isto deve-se principal ao facto de esta concentração permitir uma solubilização num período relativamente curto de tempo, ao contrário da concentração 250 mM, que necessita de cerca de um quarto do tempo de incubação mínimo analisado nos testes de viabilidade celular realizados posteriormente, apenas para se solubilizar no meio, reduzindo o seu possível efeito nas células em cultura.

Em suma, apesar de se registar solubilidade do composto a concentrações mais baixas que a escolhida, o tempo despendido na sua solubilização é demasiado longo para se obterem resultados fiáveis nos testes realizados posteriormente.

2.5 Ensaios de Viabilidade Celular com o Composto 7

Após a determinação da solubilidade do composto **6**, seguiram-se os ensaios de viabilidade em células da linha celular MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário), sendo para isso necessário um trabalho prévio de otimização das condições a usar nos ensaios.

A utilização do composto **7** para efeitos de ensaios de viabilidade celular deve-se à combinação da sua pureza elevada e da sua abundância disponível.

O composto **7** foi apenas usado nos ensaios que recorreram à observação fotográfica das células, isto é, no trabalho realizado referente à secção 2.5.1 e parte da secção 2.5.2 foram usados apenas meio de cultura e a percentagem de DMSO referidas.

Nesta fase, o principal parâmetro otimizado foi o n^0 de células semeado por poço. Para isso, foram testados vários cenários em placas de 48 poços, começando por semear 10 mil células por poço, incrementando depois para 25 mil, até a um valor máximo de 50 mil células.

No fim destes ensaios concluiu-se que 50 mil células constituía um n^0 de células mais adequado para que, no período de tempo supracitado, o poço atingisse uma elevada confluência.

2.5.1 Ensaios Usando o Método de Exclusão com Azul Tripiano

Inicialmente, a viabilidade celular foi testada usando o método de exclusão com azul tripiano, usando duas variantes do método, a primeira em que havia a tripsinização das células, e uma segunda em que este passo foi excluído, havendo assim a aplicação do corante sobre as células aderidas.

Nestes ensaios foram testadas 3 condições diferentes, em triplicado, sendo que o teor de DMSO é variável, variando entre 0%, para o controlo negativo; 0,5 %, que é a condição teste; e 10%, para o controlo positivo.

Os resultados obtidos nas células que sofreram tripsinização foram muito pouco reprodutíveis, havendo uma grande variação no n^0 de células recolhidas e contadas, sendo frequente a ausência de células para contar. Esta baixa reprodutibilidade deve-se em grande parte à dificuldade na tripsinização das células aderidas, o que levou à utilização da segunda variante do método.

Ao contrário dos resultados obtidos com as células que sofreram tripsinização, os resultados obtidos com as células que não sofreram tripsinização já são reprodutíveis, o que reforça a noção de que, neste caso, a tripsinização contribuía para a uma maior variabilidade dos resultados.

Na Figura 2.5 estão representados dois poços contendo células em cultura contendo apenas meio de cultura, isto é, o controlo negativo.

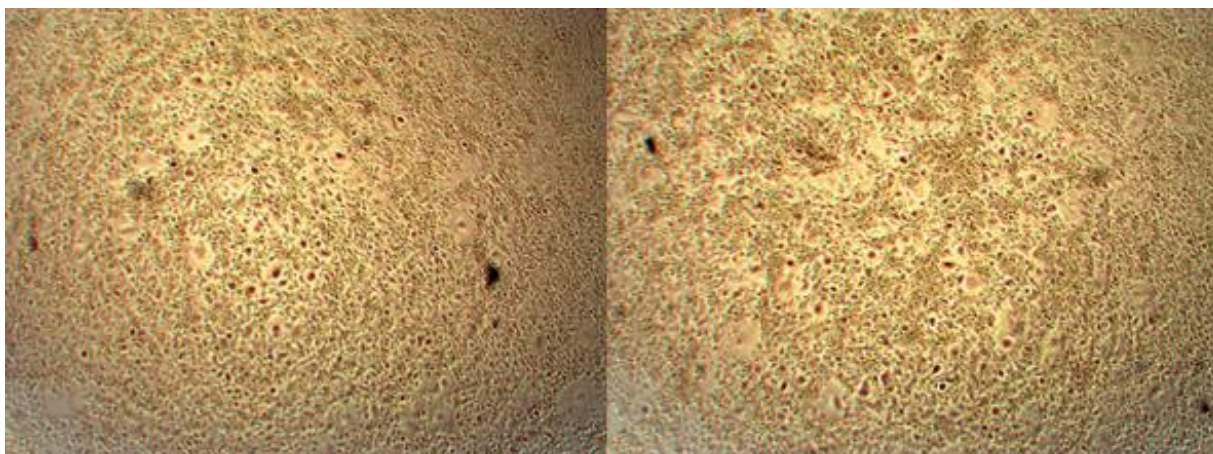


Figura 2.5 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com apenas meio de cultura durante 24h, e subsequentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripano.

Analisando ambos os poços, é possível a observação de alguns núcleos de células coradas, que devido ao nível elevado de confluência presente em ambos os poços, se deve à falta de espaço existente, o que leva à não viabilidade de algumas células.

Na Figura 2.6 estão representados dois poços contendo células em cultura contendo meio de cultura suplementado com 10% de DMSO, isto é, o controlo positivo.

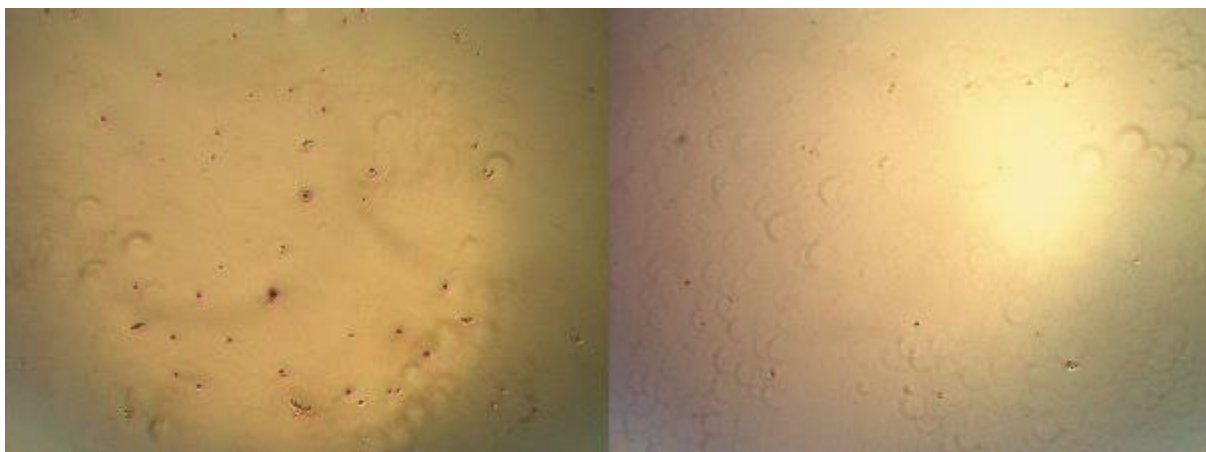


Figura 2.6 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO durante 24h, e subsequentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripano.

Analisando ambos os poços, é possível a observação de apenas algumas células individualizadas com tom corado, o que indica a não viabilidade de todas as células ainda aderidas ao poço. A ausência de grande parte das células cultivadas é devida à remoção de parte do meio de cultura, durante o processo de preparação para aplicação deste método.

Na Figura 2.7 estão representados dois poços contendo células em cultura contendo meio de cultura suplementado com 0,5% de DMSO.

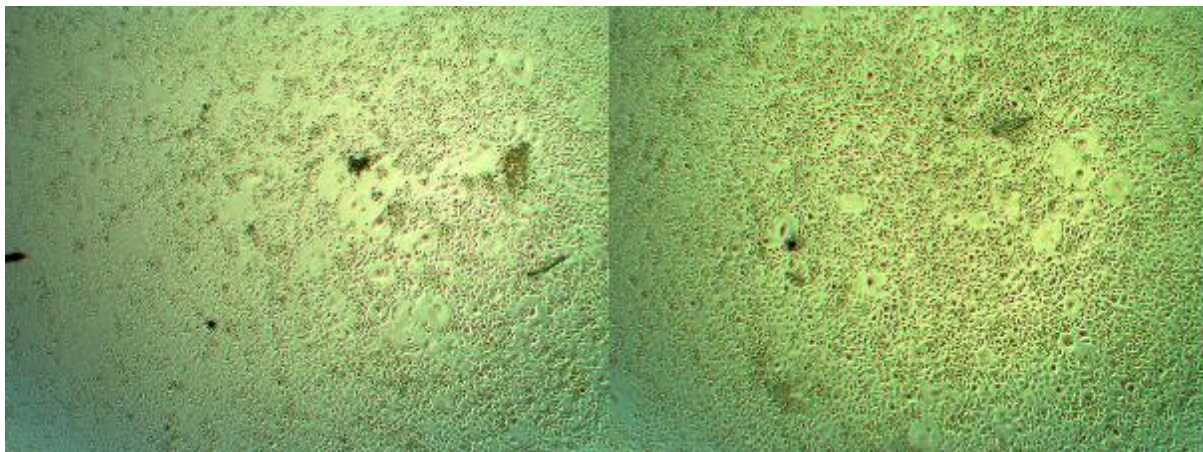


Figura 2.7 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a dois poços contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 0,5% de DMSO durante 24h, e subsequentemente sujeitos ao método de exclusão com azul tripiano.

Analisando ambos os poços, é possível a observação de pequenas regiões em que se verifica uma grande diminuição no n^0 de células, havendo uma diminuição ligeira na confluência das células. No entanto, é ainda possível observar a presença de células coradas quase individualizadas nestas regiões, o que revela uma ação citotóxica do teor de DMSO presente no meio de cultura.

Na fotografia à esquerda é ainda observável a presença de aglomerados de células em suspensão, representados pelas manchas escuras no centro da imagem. Estes aglomerados são provocados pela morte de um n^0 considerável de células numa dada região do poço. A existência deste tipo de aglomerados não é comum aos ensaios em que o meio contém 0,5% de DMSO, existindo numa maior escala nos ensaios em que o meio contém 10% de DMSO (Figura 2.8).

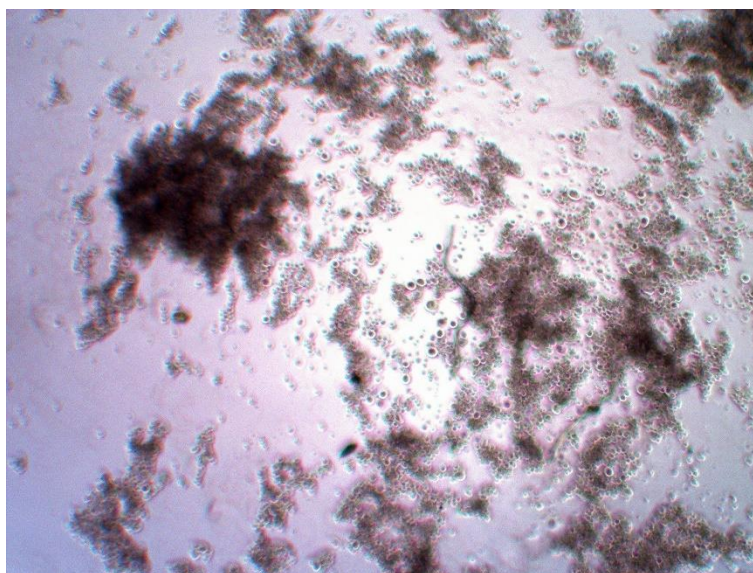


Figura 2.8 - Fotografia tirada, com ampliação 40x a um poço contendo células MDA-MB-231 em contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO durante 24h, antes da remoção de parte do meio de cultura e aplicação do método de exclusão com azul tripiano.

Em todos os pares de fotografias é notória uma grande semelhança entre estes, o que revela uma maior reprodutibilidade em comparação com o registado nos ensaios com tripsinização.

Como também é possível observar nas figuras acima, a distinção entre células coradas e não coradas é, por vezes, complicada, o que pode induzir erros na avaliação da citotoxicidade associada ao DMSO presente no meio de cultura.

2.5.2 Ensaios Realizados com Recurso a Observação Fotográfica das Células

O segundo método usado para avaliar a viabilidade celular das células em contacto com o composto **7** foi a observação fotográfica das células.

Como prova de conceito, foram realizados ensaios iniciais não contendo o composto **7**, de forma a verificar se o comportamento verificado nos ensaios com azul tripano também era verificado neste método.

Nestes ensaios iniciais foram testadas 3 condições diferentes, em triplicado, em que o teor de DMSO é variável, variando entre 0%, para o controlo negativo; 0,5 %, que é a condição teste; e 10%, para o controlo positivo, onde se pretende atingir 0% de viabilidade celular.

Na Figura 2.9 encontra-se representada uma fotografia tirada durante a realização desta dissertação que ilustra a morfologia habitual das células da linha MDA-MB-231.

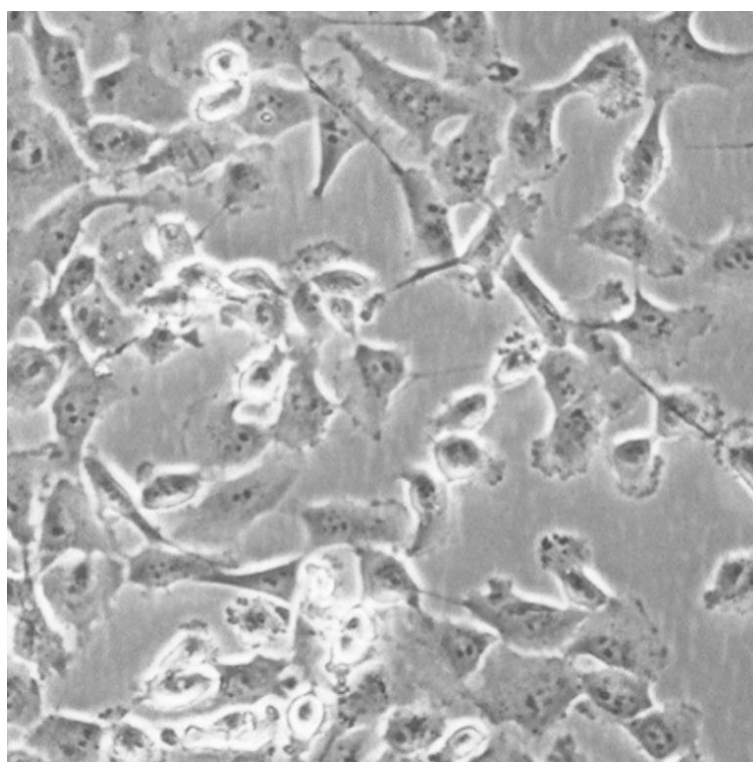


Figura 2.9 - Fotografia tirada, com ampliação 200x, a uma subcultura de células MDA-MB-231 durante a realização desta dissertação, notando-se a morfologia estelar característica desta cultura celular.

Em primeiro lugar, foi analisado o controlo positivo, isto é, o meio de cultura no qual a viabilidade celular é nula, sendo que o meio usado foi suplementado com uma dose muito elevada de DMSO, neste caso 10%. O resultado de um dos poços relativos ao controlo positivo está representado na Figura 2.10.

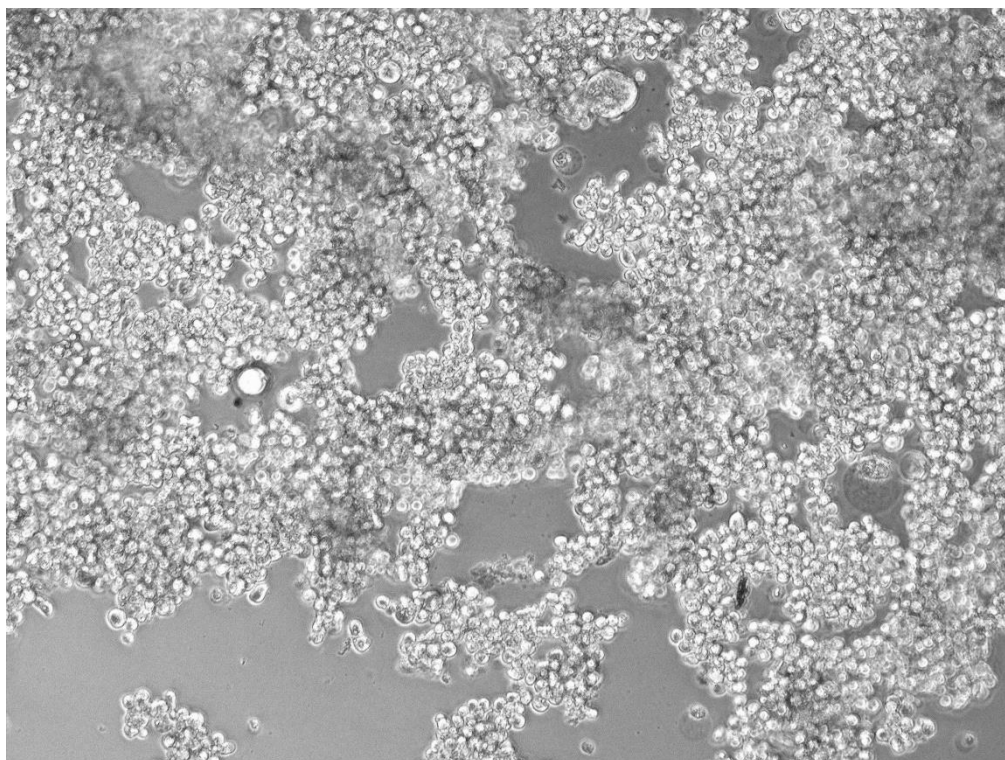


Figura 2.10 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231 depois de 24h de contacto com meio de cultura suplementado com 10% de DMSO.

Como era previsível, quando expostas a um meio de cultura contendo 10% de DMSO, as células da linha MDA-MB-231, que habitualmente possuem uma morfologia estrelada, tal como exemplificado na Figura 2.9 e na Figura 3.1, tomam uma forma globular em suspensão no meio de cultura, um indicador de morte celular. Existe ainda a presença de aglomerados celulares em suspensão, outro indicador de morte celular.

O ensaio mais interessante no conjunto destes ensaios preliminares é o ensaio em que o meio está suplementado com 0,5% de DMSO. Este ensaio permite avaliar a diminuição na viabilidade celular associada ao teor de DMSO necessário à solubilização do composto **7** no meio de cultura, por comparação com o ensaio em que as células apenas se encontravam em contacto com meio de cultura.

Na Figura 2.11 encontra-se representado o conteúdo de um poço relativo ao ensaio em que o meio está suplementado com 0,5% de DMSO. Na Figura 2.12 encontra-se representado o conteúdo de um poço relativo ao ensaio em que apenas existe meio de cultura.

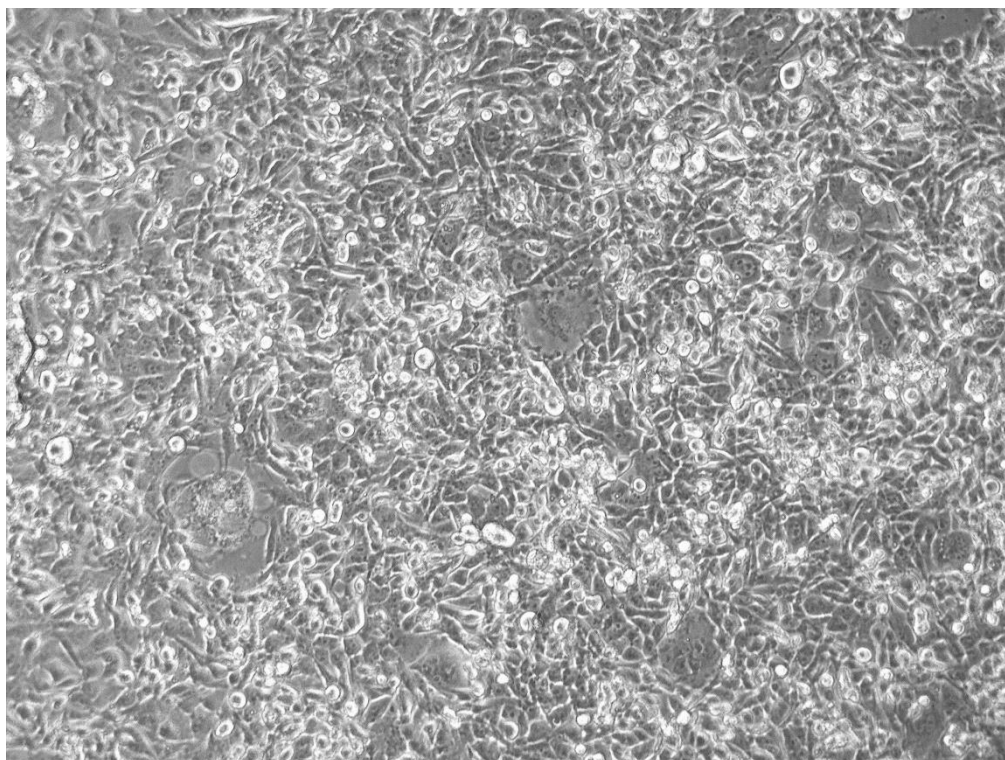


Figura 2.11 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 24h de contacto com meio de cultura suplementado com 0,5% de DMSO.

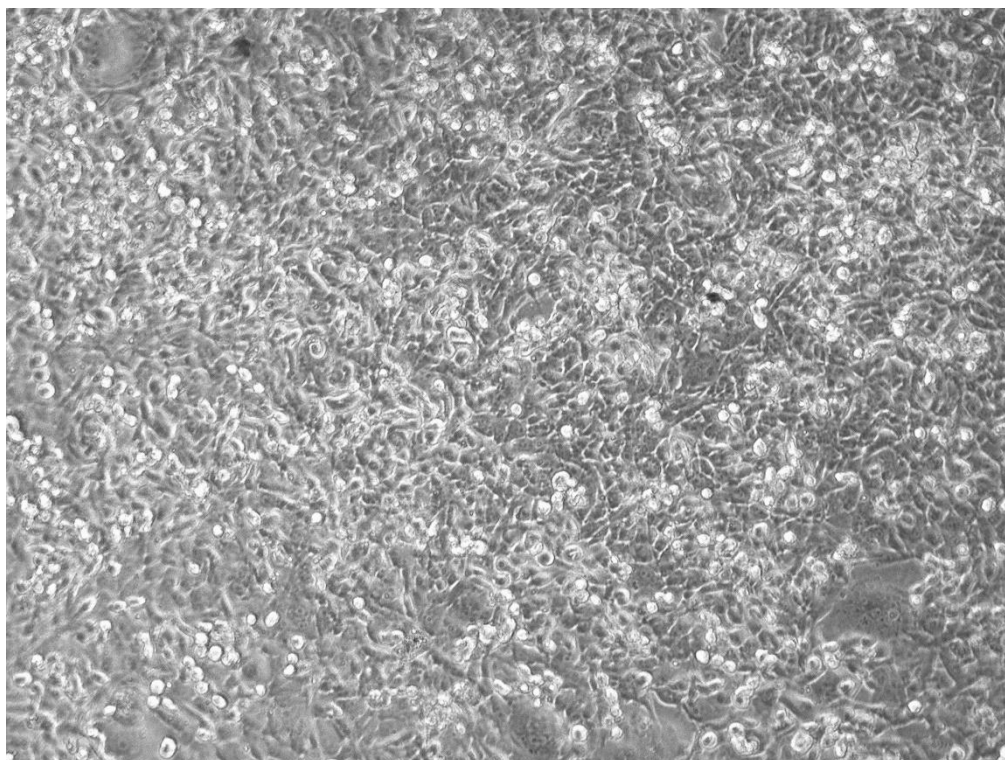


Figura 2.12 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 24h de contacto com apenas meio de cultura.

Comparando a Figura 2.11 e a Figura 2.12 pode-se verificar a existência de pequenas alterações na subcultura contendo 0,5% de DMSO, havendo o aparecimento de pequenas regiões que não contêm células ou que contêm células com forma globular, o que leva a crer que existe um pequeno efeito

citotóxico do DMSO a esta percentagem, embora não aparenta ser pronunciado de forma a adulterar os resultados posteriores.

Os resultados destes testes reforçam os resultados obtidos nos ensaios do método de exclusão com azul tripano, isto é, que o grau de citotoxicidade que o DMSO induz nas células em cultura é reduzido.

Concluídos os ensaios preliminares, passou-se ao ensaio *de facto* de viabilidade celular.

Neste ensaio final já é considerada a presença do composto **7** no meio de cultura. No entanto, o procedimento usado foi análogo aos testes anteriores, apenas com uma maior duração. Para isso foram colocadas em cultura, em duplicado, culturas contendo apenas meio de cultura, e culturas contendo meio de cultura e o composto **7**, solubilizado em 0,5% de DMSO.

A inclusão dos ensaios de controlo negativo, serve como termo de comparação aos resultados obtidos nos ensaios contendo o composto **7**.

As imagens seguintes são todas referentes ao mesmo poço, sendo que as duas primeiras são referentes ao estado da subcultura antes da mudança de meio, e as duas últimas são referentes ao estado após 48h de incubação.



Figura 2.13 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por apenas meio de cultura.

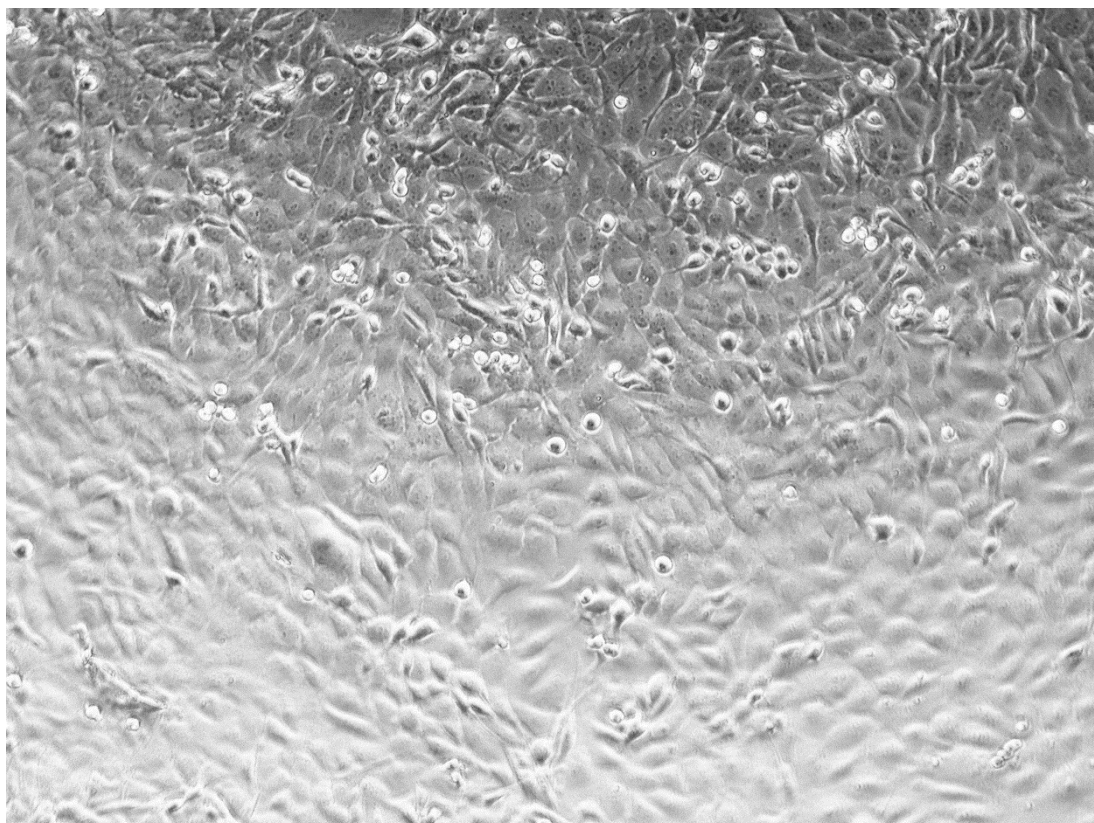


Figura 2.14 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por apenas meio de cultura.

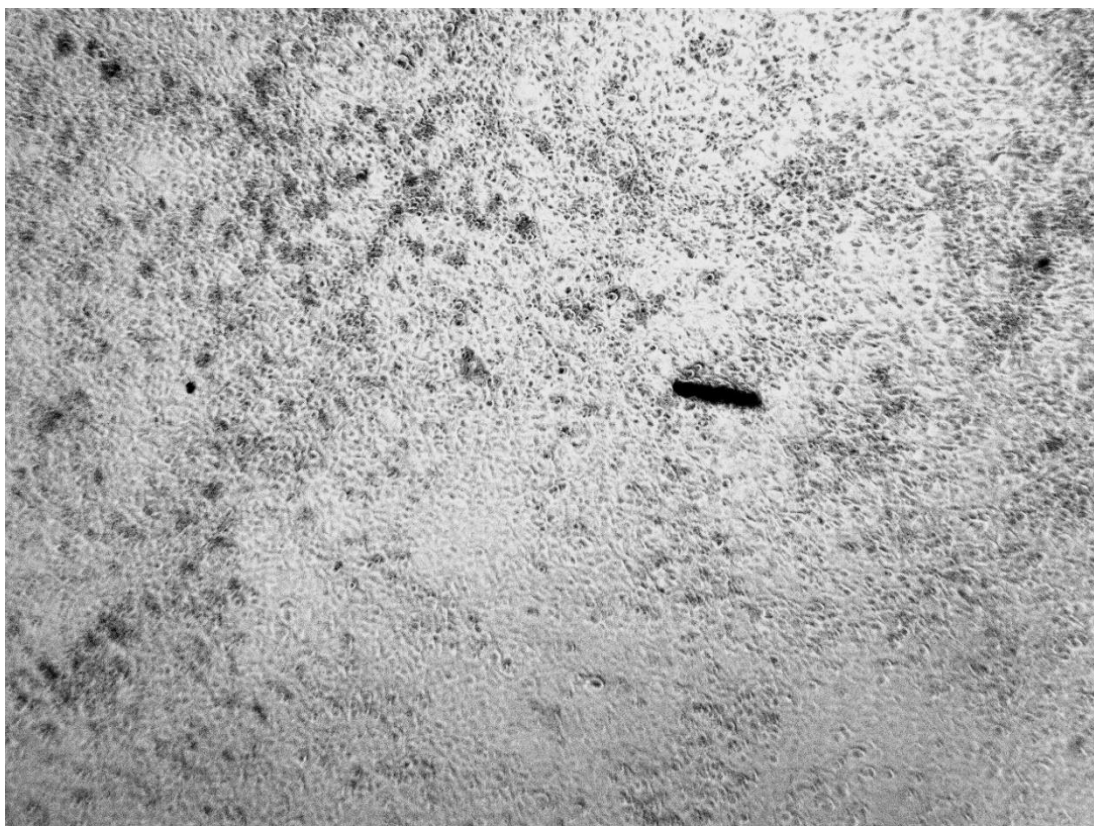


Figura 2.15 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com apenas meio de cultura.

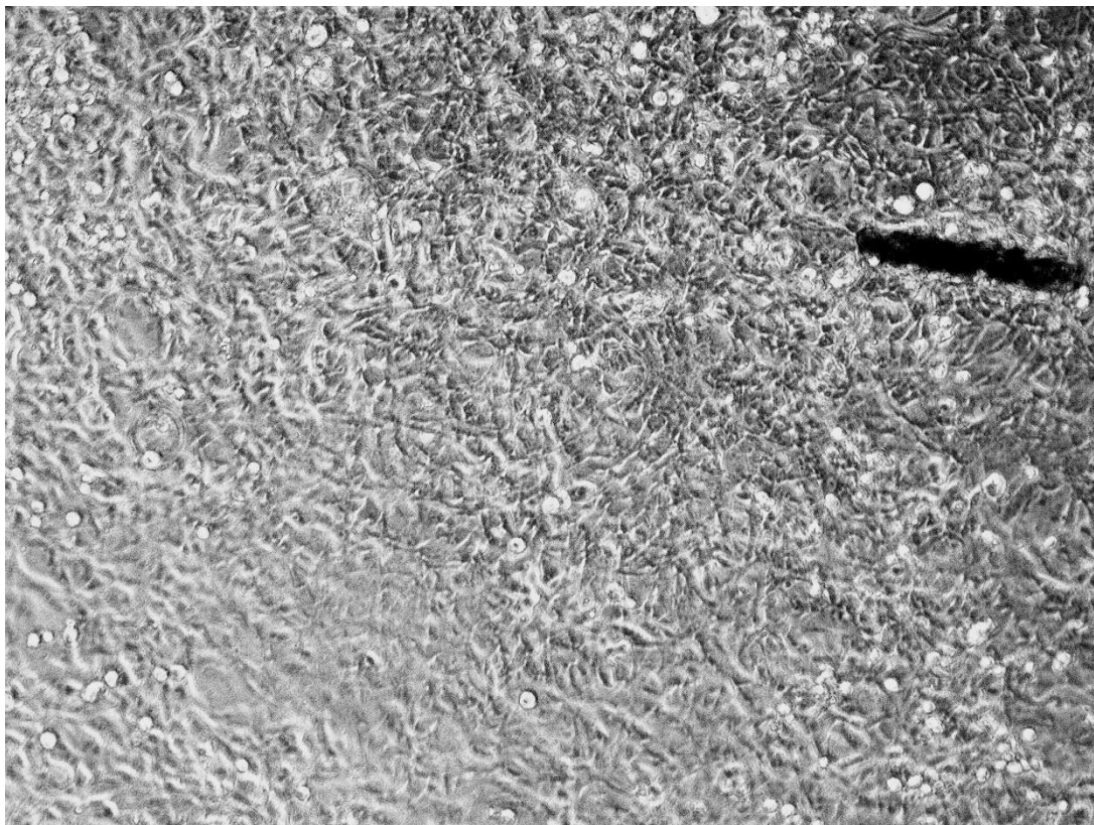


Figura 2.16 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com apenas meio de cultura.

Nas duas figuras referentes ao estado da subcultura antes da mudança de meio podemos verificar uma confluência elevada, à exceção do quadrante inferior direito na Figura 2.13, podendo ser o resultado de assimetrias na cultivagem das células.

Nas duas figuras referentes ao estado da subcultura após as 48h de incubação, podemos observar uma ligeira redução na confluência do poço, reduzindo-a cerca de 5%. Esta redução na confluência do poço é indicativa da falta de espaço para a proliferação das células no fundo do poço.

As imagens seguintes são todas referentes ao mesmo poço, sendo que as duas primeiras são referentes ao estado das células antes da mudança de meio, e as duas últimas são referentes ao estado após 48h de incubação em meio de cultura contendo o composto **7** solubilizado em 0,5% de DMSO.

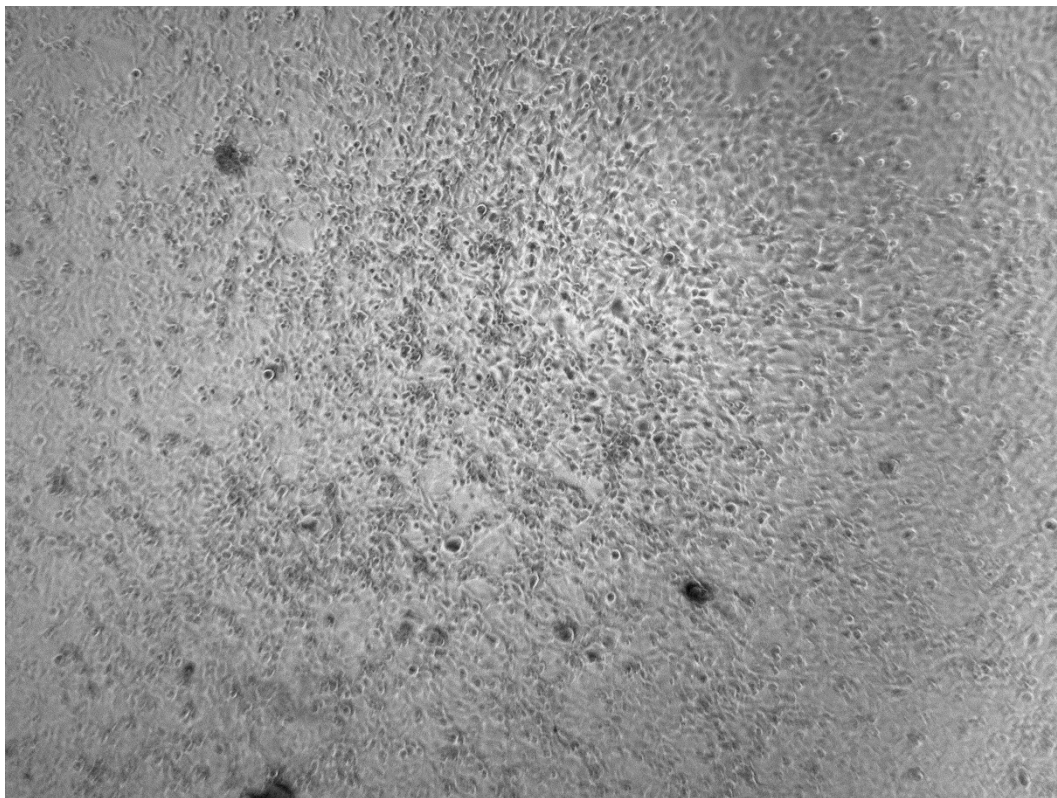


Figura 2.17 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por meio de cultura contendo o composto **7** solubilizado em 0,5% de DMSO.

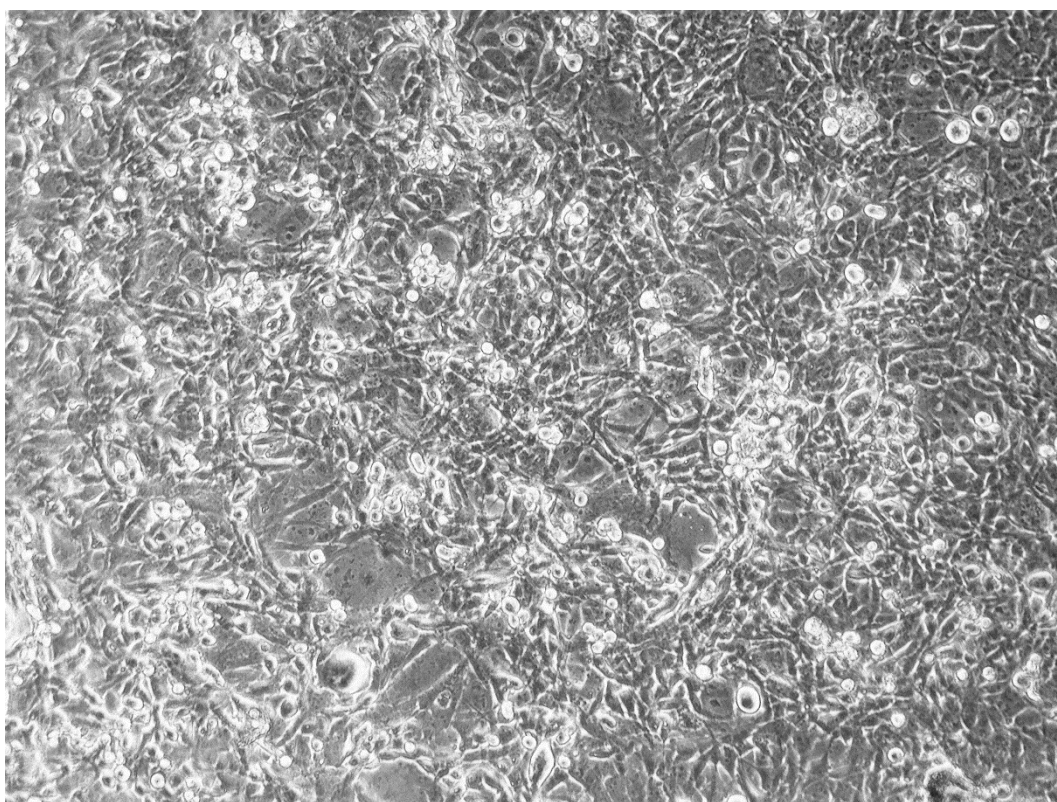


Figura 2.18 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, antes da mudança de meio por meio de cultura contendo o composto **7** solubilizado em 0,5% de DMSO.

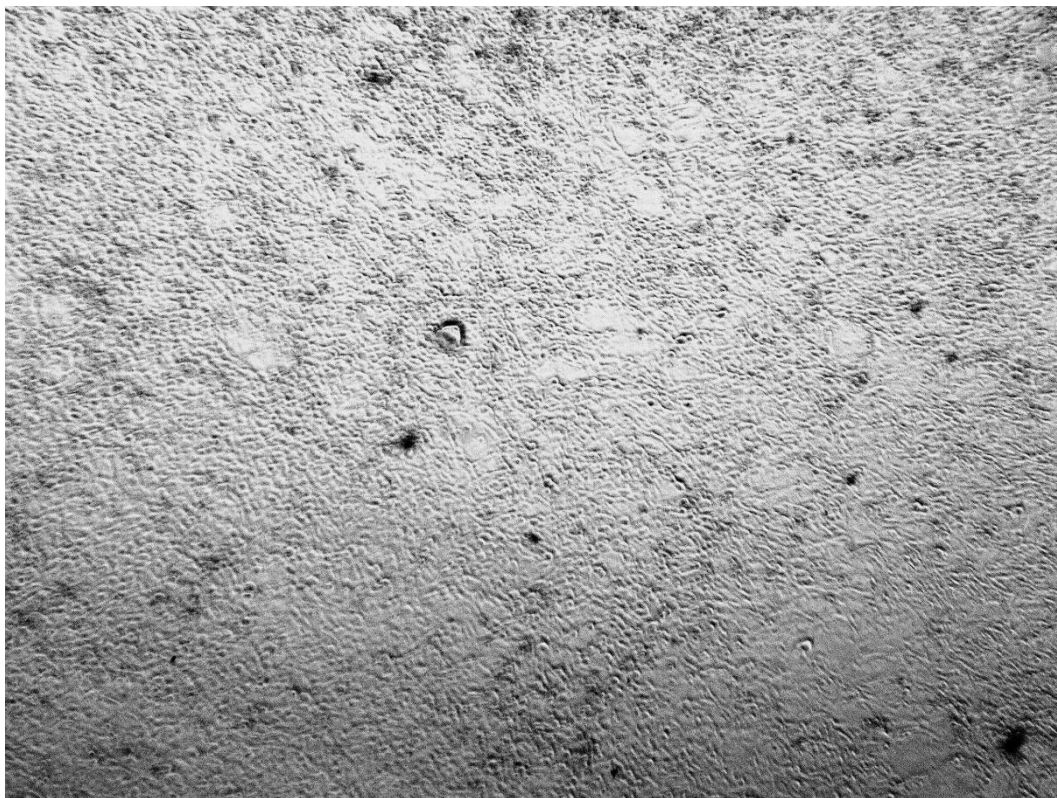


Figura 2.19 - Fotografia tirada, com ampliação 40x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com o composto **7**, solubilizado em 0,5% de DMSO.

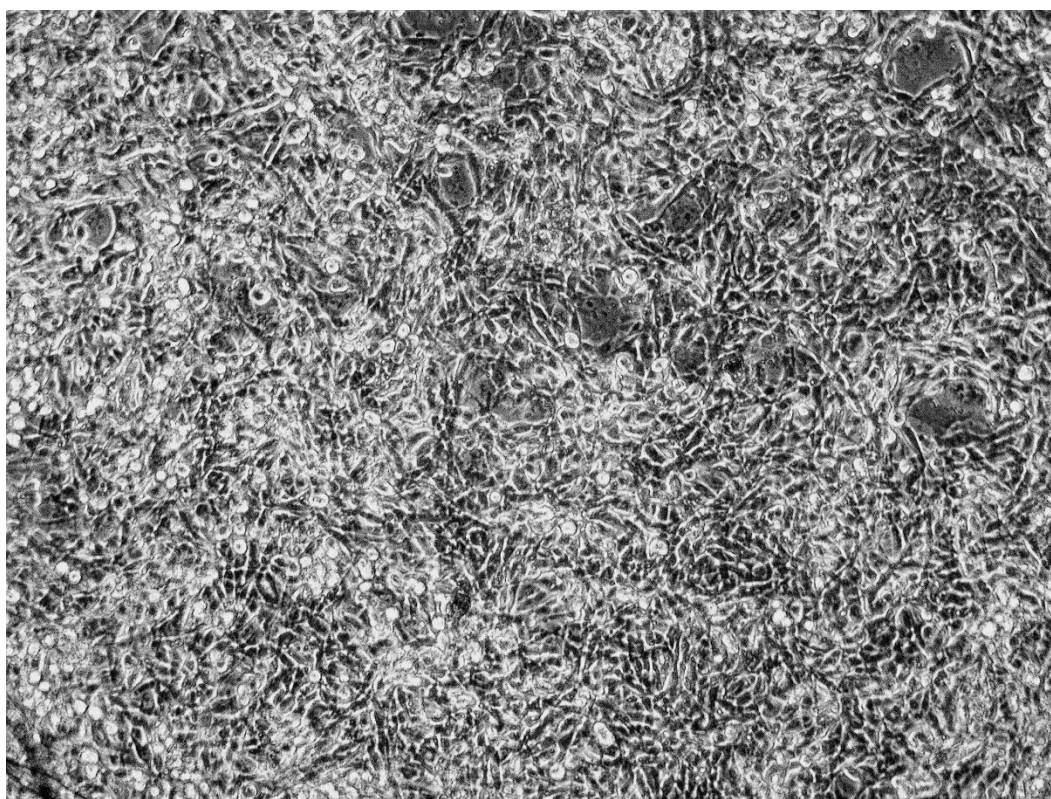


Figura 2.20 - Fotografia tirada, com ampliação 100x, a uma subcultura de células MDA-MB-231, depois de 48h de contacto com o composto **7**, solubilizado em 0,5% de DMSO.

Nas duas figuras referentes ao estado da subcultura antes da mudança de meio podemos verificar uma confluência considerável, à exceção de pequenas regiões que podem ser observadas na Figura 2.18.

Nas duas figuras referentes ao estado da subcultura após 48h de incubação, podemos observar uma redução razoável da confluência do poço contendo o composto **7**, reduzindo-a em cerca de 10 a 15%. Esta redução na confluência deve-se ao aparecimento de pequenas regiões sem células, como se pode verificar no quadrante superior direito da Figura 2.20. O aparecimento deste tipo de áreas sem células, também presentes nos ensaios com azul tripano, deve-se à ação citotóxica do DMSO.

Em termos morfológicos, verifica-se uma manutenção desta quando em contacto com o composto **7**, não existindo a formação de células com uma forma globular, o que indica uma baixa ou ausência de citotoxicidade deste composto nesta linha celular.

Capítulo 3 – Experimental

3.1 Instrumentação

Na pesagem dos compostos foi utilizada uma balança digital analítica da marca OHAUS, Pioneer™ Balances, modelo PA114, com uma precisão de 0,0001g.

As soluções foram concentradas com recurso a evaporadores rotativos da marca Büchi (modelos Rotavapor® R200 e R210) e Vacuubrand (modelo CVC 3000), à temperatura de 40°C e em vários graus de pressão reduzida, definidos de acordo com o solvente ou mistura de solventes utilizados.

Quando necessário, foi utilizado um banho de ultrassons VWR™ Ultrasonic Cleaner, para promover a dissolução de compostos.

A caracterização experimental dos compostos foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A caracterização por RMN foi realizada num aparelho BRUKER Avance 400 UltraShield, no qual foram obtidos os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN às frequências de 400,13 MHz e 100,62 MHz, respetivamente, à temperatura de 25°C. Os compostos foram dissolvidos num solvente deuterado apropriado e sujeitos a experiências de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC.

Utilizou-se como solvente deuterado para preparação das amostras clorofórmio deuterado (CDCl_3), ou metanol deuterado (CD_3OD).

Nas experiências de ^1H -RMN em CDCl_3 usou-se o pico residual do solvente (7,26 ppm, singlete) como referência. No caso dos espectros realizados em CD_3OD , o sinal usado como referência foi o sinal residual do solvente (3,31 ppm, quintuplete).⁵⁶

No caso das experiências de ^{13}C , os espectros foram calibrados a partir dos sinais do solvente deuterado usado, no caso do CDCl_3 , o valor é 77,16 ppm (triplete), e no caso do CD_3OD , o valor é 49 ppm (hepteto).⁵⁶ Os valores de desvio químico, δ , são expressos em ppm e as constantes de acoplamento em Hz.

A observação das células foi realizada usando um microscópio invertido Motic AE31E, ao qual está acoplado uma câmara fotográfica Motic Moticam 5.

A incubação das células em frascos de cultura foi realizada numa incubadora Panasonic MCO-19AIC(UV), à temperatura de 37°C, numa atmosfera controlada contendo 5% de CO_2 .

A centrifugação das células foi realizada numa centrifugadora Eppendorf Centrifuge 5702R durante 5 minutos a 1200 rotações por minuto.

3.2 Técnicas de Separação e Purificação

O acompanhamento das reações foi realizado por cromatografia em camada fina (TLC) em placas de sílica gel (Ref. 60 F254, Merck) com deteção por luz UV, no caso de compostos com grupos aromáticos, e revelação promovida com o recurso a uma solução metanólica de ácido sulfúrico a 10%,

ou de uma solução de Hanessian (solução aquosa de $\text{CeH}_8\text{Mo}_3\text{N}_2\text{O}_{12}$ e ácido sulfúrico a 10%), seguida de aquecimento com uma pistola de ar quente, dependendo da sensibilidade necessária.

Quando necessário, foi efetuada a purificação dos compostos por cromatografia em coluna, sendo a fase estacionária constituída por sílica gel 60 (0,040-0,063 mm, Ref. Merck 9385). A fase móvel de cada coluna cromatográfica é variável de caso para caso.

3.3 Síntese dos Precursores de Piranosilo (1), (2)

3.3.1 Abertura da γ -Glucofuranurolactona com Propargilamina

3.3.1.1 Procedimento

A uma solução do composto 1,2-*O*-isopropilideno- γ -glucofuranurolactona **10** (4,091 g, 0,0176 mol) em 45 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), foram adicionados 1,2 eq. de propargilamina (1,35 mL, 0,021 mol), sob atmosfera de azoto, sendo depois a reação posta a reagir, sob agitação, durante dois dias.

Ao fim de dois dias, realizou-se uma TLC para verificar o progresso da reação, verificando-se a presença de *N*-propargil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11** e do composto **10**, com igual intensidade. A reação foi então posta a reagir por mais dezasseis horas, sendo novamente verificada a progressão da reação.

Após a realização da TLC procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo. Depois, foi realizada uma cromatografia em coluna, para se purificar o composto final, sendo que o eluente usado na coluna um gradiente de misturas entre 4:1 (AcOEt: Et. Pet.), 6:1 (AcOEt: Et. Pet.), e AcOEt.

No final da coluna foi obtido o composto **11** (2,54 g, 65%) sob a forma de cristais incolores.

3.3.1.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -propargil 1,2- <i>O</i> -isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida (11)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_6$
Massa Molecular	271,27 g/mol
R _f	0,16 (2:1, AcOEt:n-Hex)
^1H -RMN (CDCl_3)	δ : 7,61 (t, $J_{\text{NH-H}7}$ = 5,2 Hz, 1H, NH); 5,97 (d, $J_{\text{H}1-\text{H}2}$ = 3,2 Hz, 1H, H-1); 5,19 (sl, 2H, OH); 4,54 (d, $J_{\text{H}2-\text{H}1}$ = 3,6 Hz, 1H, H-2); 4,50 (d, $J_{\text{H}3-\text{H}4}$ = 5,2 Hz, 1H, H-4); 4,35-4,31 (m, 2H, H-3/H-5); 4,09 (d, $J_{\text{H}7-\text{H}9}$ = 3,6 Hz, 2H, H-7); 2,38 (s, 1H, H-9); 1,48 (s, 3H, CH_3 i-Prop); 1,31 (s, 3H, CH_3 i-Prop) ppm
^{13}C -RMN (CDCl_3)	δ : 172,4 (C-6); 112,0 (CQ i-Prop); 105,0 (C-1); 85,0 (C-2); 80,6 (C-5); 79,2 (C-8); 75,0 (C-3); 72,0 (C-9); 69,8 (C-4); 29,1 (C-7); 26,7 (CH_3 i-Prop); 26,2 (CH_3 i-Prop) ppm

3.3.2 Remoção do Grupo Di-*O*-Isopropilideno da *N*-Propargil-Glucofuranuronamida

3.3.2.1 Procedimento

Num balão apropriado, foi dissolvido *N*-propargil 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **11** (1,28 g, 0,0047 mol) numa solução aquosa de ácido trifluoroacético (TFA) a 73% (15 mL), sendo depois posta a reagir, sob agitação, a temperatura ambiente, durante duas horas.

Ao fim de três horas, foi realizada uma TLC para verificar o progresso da reação, em que se verificou a presença do composto final. Após a verificação da presença do composto **12**, evaporou-se o ácido trifluoroacético que não reagiu, usando o evaporador rotativo.

3.3.2.2 Caracterização

O composto **12** não foi isolado, tendo o seu crude usado na reação descrita seguidamente.

3.3.3 Acetilação da *N*-Propargil Glucofuranuronamida

3.3.3.1 Procedimento

Usando o balão utilizado na reação anterior, contendo *N*-propargil- α,β -D-glucopiruranuronamida **12**, foram adicionados piridina (8 mL) e anidrido acético (6 mL), sob atmosfera de azoto, sendo depois a reação posta a reagir, sob agitação, durante uma hora.

No final de meia hora de reação foi realizada uma TLC para se verificar o progresso da reação, verificando-se que esta já estava completa, sendo de seguida realizada uma evaporação do solvente no evaporador rotativo. Após a evaporação do solvente, foi realizada uma cromatografia em coluna para purificar o composto final, em que foi usado como eluente da coluna uma mistura 1:1 (AcOEt:n-Hex), e uma mistura 2:1 (AcOEt:n-Hex) como eluente na eluição das TLC. No final da coluna de purificação foi obtido o composto *N*-propargil-1,2,3,4- tetra-*O*-acetil- α,β -D-glucopiruranuronamida **13** (1,15 g, 61%).

3.3.3.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -Propargil-1,2,3,4-tetra- <i>O</i> -acetil- α,β -D-glucopiruranuramida (13)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	399,35 g/mol
R _f	0,35 (2:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	δ : 6,58 (sl, 1 H, NH α), 6,49 (sl, 0,5 H, NH β), 6,38 (d, $J_{H1-H2(\alpha)} = 3,2$ Hz, 1 H, H-1 α), 5,75 (d, $J_{H1-H2(\beta)} = 8,0$ Hz, 0,5 H, H-1 β), 5,52 (t, $J_{H3-H2(\alpha)} = J_{H3-H4(\alpha)} = 9,8$ Hz, 1 H, H-3 α), 5,30 (t, $J_{H3-H2(\beta)} = J_{H3-H4(\beta)} = 9,2$ Hz, 0,5 H, H-3 β), 5,23-5,03 (m, 3 H, H-4 α , H-4 β , H-2 α , H-2 β), 4,32 (d, $J_{H5-H4(\alpha)} = 10,0$ Hz, 1 H, H-5 α), 4,15* (d, $J_{H5-H4(\beta)} = 9,7$ Hz, 0,5 H, H-5 β), 4,09-3,93 (m, 3 H, H-7a/H-7b (α , β)), 2,26-2,5 (m, 1,5 H, H-9 (α , β)), 2,19 (s, 3 H, CH ₃ -OAc, α), 2,15 (s, 1,5H, CH ₃ -OAc, β), 2,09, 2,08, 2,07, 2,05, 2,04, 2,02 (5 s, 13,5 H, 3 \times CH ₃ -OAc, α , 3 \times CH ₃ -OAc, β) ppm *Sobreposição com picos de AcOEt
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	δ : 170,0, 169,8, 169,4, 169,4, 169,4, 168,8, 168,8 (4 \times CO, OAc, α , β), 166,3 (C-6 α), 165,8 (C-6 β), 91,5 (C-1 β), 88,4 (C-1 α), 78,7 (C-8, α , β), 72,3 (C-5 β), 72,3 (C-9 β), 72,0 (C-9 α), 71,9 (C-3 β), 70,3 (C-5 α), 70,0 (C-2 β), 68,9, 68,8, 68,8, 68,7 (C-2 α , C-3 α , C-4 α , C-4 β), 29,0, 29,0 (C-9, α , β), 21,2, 21,0, 20,8, 20,8, 20,7, 20,6, 20,6, 20,5 (4 \times CH ₃ -Ac, α , β) ppm

3.3.4 Acoplamento da 2-Acetamido-6-Cloropurina ao Composto **13**

3.3.4.1 Procedimento

A uma solução de 2-Acetamido-6-cloropurina (198 mg, 0,0009 mol) em acetonitrilo anidro (4,81 mL) foi adicionado *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) (0,48 mL, 0,00018 mol), sendo a mistura agitada durante 20 min, à temperatura ambiente. Uma solução de *N*-propargil 1,2,3,4- tetra-*O*-acetil- α,β -D-glucopiruranuramida (250 mg, 0,00063 mol) em acetonitrilo anidro (2,2 mL) foi então adicionada à solução anterior, seguida da adição lenta de triflato de trimetilsililo (TMSOTf) (0,626 mL, 0,0035 mol). A mistura reacional foi então colocada a reagir, sob agitação, dentro do sintetizador de microndas, a 150 W e 250 psi, a 65 °C durante 1 hora.

Após 1 hora, e depois de se ter confirmado o progresso da reação por TLC, procedeu-se a uma extração líquido-líquido usando CH₂Cl₂ e uma solução saturada de NaHCO₃. As fases orgânicas recolhidas foram depois secas usando MgSO₄ anidro e concentradas no evaporador rotativo. Depois foi realizada uma cromatografia em coluna usando um eluente com gradiente entre 3:1 (AcOEt:n-Hex) e 5:1 (AcOEt:n-Hex), obtendo-se os compostos **1** e **2**.

No final da purificação por cromatografia em coluna, foram obtidos os compostos **1** (100 mg, 29%) e **2** (48 mg, 14%).

3.3.4.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -Propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-9-il)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil-β-D-glucopirranuronamida (1)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O ₉
Massa Molecular	550,91 g/mol
R _f	0,54 (8:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	<p>δ: 8,45 (sl, 1H, NHAc); 8,16 (s, 1H, H-8); 5,88 (d, J_{H1'-H2'}=8,8 Hz, 1H, H-1'); 5,75 (t, J_{H2'-H3'}=J_{H2'-H1'}=9,2 Hz, 1H, H-2'); 5,50 (t, J_{H3'-H4'}=J_{H3'-H2'}=9,2 Hz, 1H, H-3'); 5,42 (t, J_{H4'-H3'}=J_{H4'-H5'}=9,2 Hz, 1H, H-4'); 4,35 (d, J_{H5'-H4'}=8,8 Hz, 1H, H-5'); 4,08 (ddd, J_{H7'a-H7'b}=17,6 Hz; J_{H7'a-NH}=5,2 Hz; J_{H7'a-H9'}=2,4 Hz, 2H, H-7'a); 3,99 (ddd, J_{H7'b-H7'a}=17,6 Hz; J_{H7'b-NH}=5,2 Hz; J_{H7'b-H9'}=2,4 Hz, 2H, H-7'b); 2,49 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2,21 (t, J_{H9'-H7'}=2,0 Hz, 1H, H-9'); 2,12 (s, 3H, OAc); 2,06 (s, 3H, OAc); 1,86 (s, 3H, OAc) ppm</p>
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	<p>δ: 169,9, 169,6, 169,1 (4 × CO, OAc); 165,6 (CO, NHAc); 152,5 (C-2/C-6); 152,5 (C-4); 151,8 (C-2/C-6); 142,5 (C-8); 128,0 (C-5); 81,0 (C-1'); 79,1 (C-8'); 78,6 (C-8'); 75,2 (C-5'); 72,1 (C-3'); 71,9 (C-9'); 69,5 (C-2'); 69,0 (C-4'); 29,8 (C-7'); 25,3 (CH₃ NHAc); 20,8 (CH₃, OAc); 20,6 (CH₃, OAc); 20,3 (CH₃, OAc) ppm</p>

Nome	<i>N</i> -Propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-7-il)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopirranuronamida (2)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O ₉
Massa Molecular	550,91 g/mol
R _f	0,41 (8:1, AcOEt:Et. Pet.)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	δ : 8,61 (sl, 1H, H-8); 6,71 (t, 1H, NH); 6,26 (sl, 1H, H-1'); 5,69-5,64 (m, 2H, H-2'/H-3'); 5,46 (t, $J_{H4'-H5'} = J_{H4'-H3'} = 8,8$ Hz, 1H, H-4'); 4,55 (dl, 1H, H-5'); 4,82 (dd, $J_{H4'-H5'} = 8,4$ Hz; $J_{H4'-H3'} = 4,0$ Hz, 1H, H-4'); 4,08-3,94 (m, 2H, H-7'a/H-7'b); 2,48 (s, 3H, CH ₃ NHAc); 2,19 (tl, 1H, H-9'); 2,10 (s, 3H, OAc); 2,14 (s, 3H, OAc); 2,03 (s, 3H, OAc); 1,86 (s, 3H, OAc) ppm
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	δ : 170,0, 169,7, 169,3 (4 \times CO, OAc); 152,8; 118,4; 74,9 (C-5'); 72,3 (C-3'); 71,9 (C-9'); 68,9 (C-4'); 29,8 (C-7'); 25,2 (CH ₃ NHAc); 20,8 (CH ₃ , OAc); 20,7 (CH ₃ , OAc); 20,4 (CH ₃ , OAc) ppm

3.4 Síntese dos Precursores de Furanosilo (3), (4)

3.4.1 Abertura da γ -Glucofuranurolactona com Propargilamina

3.4.1.1 Procedimento

Este passo já se encontra descrito em 3.3.1, já que é comum à síntese dos dois tipos de nucleósido sintetizados.

3.4.1.2 Caracterização

O composto **11** já se encontra caracterizado em 3.3.1.2.

3.4.2 Acetilação da *N*-Propargil Glucofuranuronamida

3.4.2.1 Procedimento

A uma solução de *N*-propargil 1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida (1,22 g, 0,0045 mol) (**11**) em piridina (8 mL), sob atmosfera de azoto, foi adicionado anidrido acético (6 mL), sendo depois a reação posta a reagir, sob agitação, durante uma hora.

No final de uma hora de reação foi realizada uma TLC para se verificar o progresso da reação, verificando-se que esta já estava completa, sendo de seguida realizadas duas lavagens com H₂O e uma lavagem com uma solução de HCl 2M. As fases orgânicas recolhidas foram depois secas usando MgSO₄ anidro e concentradas no evaporador rotativo.

3.4.2.2 Caracterização

O composto **14** não foi isolado, tendo o seu crude usado na reação descrita seguidamente.

3.4.3 Remoção do Grupo Di-*O*-Isopropilideno da *N*-Propargil-Glucofuranuronamida

3.4.3.1 Procedimento

Usando o balão utilizado na reação anterior, contendo *N*-Propargil-3,5-di-*O*-acetil-1,2-*O*-isopropilideno- α -D-glucofuranuronamida **14**, foram adicionados 15 mL de uma solução aquosa de ácido trifluoroacético a 73%, tendo depois deixado a reação a reagir, sob agitação, a temperatura ambiente, durante duas horas.

Ao fim de duas horas de reação, foi realizada uma TLC para verificar o progresso da reação, em que se verificou a presença do composto final. Após a verificação da presença do composto **15**, evaporou-se o ácido trifluoroacético que não reagiu, usando o evaporador rotativo.

3.4.3.2 Caracterização

O composto **15** não foi isolado, tendo o seu crude usado na reação descrita seguidamente.

3.4.4 Acetilação da *N*-Propargil-3,5-di-*O*-acetil- α,β -D-glucofuranuronamida

3.4.4.1 Procedimento

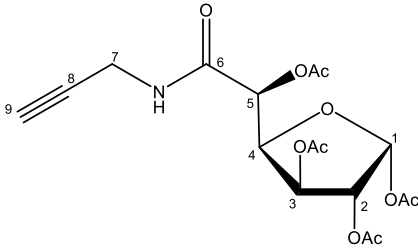
Usando o balão utilizado na reação anterior, foram adicionados piridina (8 mL) e anidrido acético (6 mL), sob agitação e atmosfera inerte, tendo a reação sido posta a reagir durante uma hora.

Ao fim de uma hora de reação, foi realizada uma TLC, para verificar se a reação tinha sido completa, o que se verificou. Após a verificação por TLC, foi realizado o work-up da reação envolvendo três lavagens com uma solução de HCl 2M. As fases orgânicas recolhidas foram depois secas usando MgSO₄ anidro e concentradas no evaporador rotativo.

Após o work-up, sendo depois preparada uma coluna de cromatografia de forma a purificar os produtos finais. O eluente usado como fase móvel da coluna foi uma mistura 1:1 (AcOEt:n-Hex), e para a eluição das TLC uma mistura 2:1 (AcOEt:n-Hex). No final da coluna de purificação foi obtido o composto **16** *N*-Propargil-1,2,3,5-tetra-*O*-acetil- α,β -D-glucofuranuronamida (256 mg);

3.4.4.2 Caracterização

A caracterização do composto **16** foi apenas possível para o anômero α .

Nome	<i>N</i> -Propargil-1,2,3,5-tetra- <i>O</i> -acetil- α -D-glucofuranuronamida (16)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	399,35 g/mol
R _f	0,28 (2:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	δ : 6,44 (d, J _{H1-H2} =4,4 Hz, 1H, H-1); 6,31 (sl, 1H, NH); 5,64 (dd aprox. t, J _{H3-H4} =5,5 Hz; J _{H2-H3} = 4,8 Hz, 1H, H-3); 5,32-5,26 (m, 2H, H-5/H-2); 4,79 (t, J _{H3-H4} = 6,0 Hz, 1H, H-4); 4,14-4,06 (ddd*, 1H, H-7a); 4,01 (ddd, J _{H7a-H7b} =17,6 Hz; J _{H7b-NH} =4,9 Hz; J _{H7b-H9} = 2,5 Hz, 1H, H-7b); 2,26 (t, J _{H9-H7b} = 2,4 Hz; J _{H9,H7a} =2,4 Hz, 1H, H-9); 2,16 (s, 3H, OAc); 2,09 (s, 3H, OAc), 2,08 (s, 6H, 2x OAc) ppm * - Sobreposição com picos de AcOEt
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	δ : 169,7 (CQ, OAc); 169,5 (CQ, OAc); 169,5 (CQ, OAc); 169,3 (CQ, OAc); 166,4 (C-6); 93,5 (C-1); 78,8 (C-8); 76,9 (C-4); 75,6 (C-2); 73,6 (C-3); 72,4 (C-9); 70,2 (C-5); 29,4 (C-7); 21,2 (CH ₃ , OAc); 21,0 (CH ₃ , OAc); 20,8 (CH ₃ , OAc); 20,5 (CH ₃ , OAc) ppm

3.4.5 Acoplamento da 2-Acetamido-6-Cloropurina ao Composto **16**

3.4.5.1 Procedimento

A uma solução de 2-Acetamido-6-cloropurina (198 mg, 0,0009 mol) em acetonitrilo anidro (4,81 mL) foi adicionado *N,O*-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA) (0,48 mL, 0,00018 mol), sendo a mistura agitada durante 20 min, à temperatura ambiente. Uma solução de *N*-propargil 1,2,3,4- tetra-*O*-acetil- α,β -D-glucofuranuronamida (250 mg, 0,00063 mol) em acetonitrilo anidro (2,2 mL) foi então adicionada à solução anterior, seguida da adição lenta de triflato de trimetilsililo (TMSOTf) (0,626 mL, 0,0035 mol). A mistura reacional foi então colocada a reagir, sob agitação, dentro do sintetizador de microndas, a 150 W e 250 psi, a 65 °C durante 1 hora.

Após 1 hora, depois de se ter confirmado o progresso da reação por TLC, procedeu-se a uma extração líquido-líquido usando CH₂Cl₂ e uma solução saturada de NaHCO₃. As fases orgânicas recolhidas foram depois secas usando MgSO₄ anidro e concentradas no evaporador rotativo. Depois foi realizada uma cromatografia em coluna usando um eluente com gradiente entre 3:1 (AcOEt:n-Hex) e 5:1 (AcOEt:n-Hex), obtendo-se os compostos **3** e **4**.

No final da purificação por cromatografia em coluna, foram obtidos os compostos **3** (100 mg, 29%) e **4** (48 mg, 14%).

3.4.5.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -Propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-9-il)-2,3,5-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucofuranuronamida (3)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O ₉
Massa Molecular	550,91 g/mol
R _f	0,26 (8:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	δ : 8,28 (s, 1H, H-8); 8,23 (sl, 1H, NHAc); 6,71 (t, 1H, NH); 6,18 (d, $J_{H1'-H2'}=2,0$ Hz, 1H, H-1'); 5,64 (dd, $J_{H3'-H4'}=3,8$ Hz; $J_{H3'-H2'}=1,2$ Hz, 1H, H-3'); 5,46 (d*, $J_{H5'-H4'}=8,8$ Hz, 1H, H-5'); 5,45 (d*, $J_{H2'-H3'}=2$ Hz; 1H, H-2'); 4,82 (dd, $J_{H4'-H5'}=8,4$ Hz; $J_{H4'-H3'}=4,0$ Hz, 1H, H-4'); 4,03 (dd, $J_{H7'-NH}=5,2$ Hz; $J_{H7'a-H7'b}=2,4$ Hz, 2H, H-7'a/b); 2,50 (s, 3H, CH ₃ NHAc); 2,17 (t*, $J_{H9'-H7'}=2,4$ Hz, 1H, H-9'); 2,17 (s*, 3H, OAc); 2,14(s, 3H, OAc); 2,09 (s, 3H, OAc) ppm * - Sobrepostos
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	δ : 169,6, 169,2, 168,7 (4 x CO, OAc); 166,1 (C-6'); 152,4 (C-6/C-2); 152,2 (C-4); 151,8 (C-2/C-6); 142,5 (C-8); 128,1 (C-5); 88,3 (C-1'); 80,0 (C-4'); 79,5 (C-2'); 78,6 (C-8'); 73,5 (C-3'); 72,3 (C-9'); 69,3 (C-5'); 29,5 (C-7'); 25,3 (CH ₃ NHAc); 20,8 (CH ₃ , OAc); 20,7 (CH ₃ , OAc); 20,7 (CH ₃ , OAc) ppm

Nome	<i>N</i> -Propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-7-il)-2,3,5-tri- <i>O</i> -acetil-β-D-glucufuranuronamida (4)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₆ O ₉
Massa Molecular	550,91 g/mol
Rf	0,15 (8:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (MeOD)	<p>δ: 8,89 (s, 1H, H-8); 6,96 (t, J_{NH-H7'}=4,8 Hz, 1H, NH); 6,60 (sl, 1H, H-1'); 5,56 (d, J_{H3'-H4'}= 3,2 Hz, 1H, H-3'); 5,51 (d, J_{H5'-H4'}= 8,8 Hz, 1H, H-5'); 5,34 (sl, 1H, H-2'); 4,85 (dd, J_{H4'-H5'}= 8,8 Hz; J_{H4'-H3'}= 3,2 Hz, 1H, H-4'); 4,13 (ddd, J_{H7'a-H7'b}= 17,6 Hz; J_{H7'a-NH}= 5,12 Hz; J_{H7'a-H9'}= 2,4 Hz 1H, H-7'a); 4,02 (ddd, J_{H7'b-H7'a}= 17,2 Hz; J_{H7'b-NH}= 4,8 Hz; J_{H7'b-H9'}= 2,4 Hz, 2H, H-7'b); 2,56 (s, 3H, CH₃ NHAc); 2,22* (tl, 1H, H-9'); 2,21* (s, 3H, CH₃ OAc); 2,15 (s, 3H, CH₃ OAc); 1,96 (s, 3H, CH₃ OAc) ppm</p> <p>*Sobreposição</p>
¹³ C-RMN (MeOD)	<p>δ: 169,9 (CO, OAc); 168,9 (2 x CO, OAc); 168,4 (CO, OAc); 166,2 (C-6'); 163,3 (C-4); 153,1(C-2/C-6); 147,9 (C-8); 143,3 (C-2/C-6); 118,2 (C-5); 90,5 (C-1'); 80,9 (C-4'); 80,2 (C-2'); 78,6 (C-8'); 73,5 (C-3'); 72,5 (C-9'); 69,0 (C-5'); 29,5 (C-7'); 25,3 (CH₃, NHAc); 20,7 (3 x CH₃, OAc) ppm</p>

3.5 Síntese do 6-Azido Glucósido de Metilo (5)

3.5.1 Proteção do Grupo Hidroxilo em C-6

3.5.1.1 Procedimento

A uma solução de α -D-glucopiranosídeo de metilo (3 g; 0,01527 mol) (**17**) em piridina (Py; 30 mL), adicionaram-se 1,1 eq (4,6827 g; 0,016797 mol) de cloreto de tritilo (TrCl). Esta mistura foi deixada a reagir, com agitação, durante dezoito horas, a temperatura ambiente e sob atmosfera de azoto. Ao fim de dezoito horas, a revelação por TLC verificou a existência de 6-*O*-tritol- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**18**).

3.5.1.2 Caracterização

O composto **18** não foi isolado, tendo o seu crude usado na reação descrita seguidamente.

3.5.2 Acetilação do 6-*O*-Tritil-Glucopiranosídeo de Metilo

3.5.2.1 Procedimento

À solução de 6-*O*-tritol- α -D-glucopiranosídeo de metilo **18** previamente preparada na reação anterior, adicionou-se anidrido acético (10 mL), voltando a reagir durante uma hora, sob atmosfera de azoto e com agitação, à temperatura ambiente.

Ao fim de uma horas, a revelação por TLC, usando o eluente acetato de etilo, verifica-se a presença de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-tritol- α -D-glucopiranosídeo de metilo **19**. Após a confirmação da presença do composto **19**, o solvente foi evaporado usando o evaporador rotativo, sendo depois realizada uma extração com diclorometano para dissolver o resíduo, e 3 lavagens com água, sendo depois a fase orgânica seca com sulfato de magnésio anidro.

3.5.2.2 Caracterização

O composto **19** não foi isolado, tendo o seu crude usado na reação descrita seguidamente.

3.5.3 Desproteção do Grupo Tritilo em C-6

3.5.3.1 Procedimento

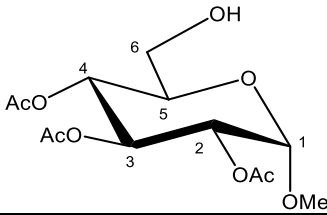
À solução de de 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-tritol- α -D-glucopiranosídeo de metilo **19**, resultante da reação anterior, foram adicionados 30 mL de uma solução aquosa de ácido acético (AcOH) a 60%. Esta reação foi colocada a reagir sob agitação, à temperatura de 60°C, durante dois dias horas.

Ao final dos dois dias, verificou-se que a reação estava quase completa, procedendo-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo, e à extração dos compostos finais, em que se dissolveu o resíduo em diclorometano (CH₂Cl₂), e extraiu-se 1x com solução saturada de NaHCO₃ e 2x com

solução saturada de NaCl, sendo a fase orgânica seca com MgSO_4 anidro e concentrada no evaporador rotativo.

Após a extração, foi preparada uma coluna de cromatografia para purificar os dois compostos obtidos, sendo que o eluente usado foi uma mistura 1:3 (AcOEt:Et. Pet.). Foram recolhidas duas frações importantes, sendo que uma delas, correspondente à mistura entre o composto **20** e um seu isômero, foi novamente separada por coluna de cromatografia, sendo usado um eluente 1:2 (AcOEt: Et. Pet.). A massa total de 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucopiranosídeo de metilo **20** obtida foi de 0,931 g.

3.5.3.2 Caracterização

Nome	2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- α -D-glucopiranosídeo de metilo (20)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	$\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{O}_9$
Massa Molecular	320,29 g/mol
R _f	0,45 (1:1, AcOEt:Hex)
^1H -RMN (CDCl_3)	δ : 5,52 (dd aprox. t, $J_{\text{H4-H3}}=J_{\text{H4-H5}}=10,0$ Hz, 1H, H-4); 5,05 (dd aprox. t, $J_{\text{H3-H4}}=J_{\text{H3-H2}}=10,0$ Hz, 1H, H-3); 4,98 (d, $J_{\text{H1-H2}}=3,6$ Hz, 1H, H-1); 4,88 (dd, $J_{\text{H2-H3}}=10,0$ Hz; $J_{\text{H2-H1}}=3,6$ Hz, 1H, H-2); 3,80 (ddd, $J_{\text{H5-H4}}=10,0$ Hz, $J_{\text{H5-H6a}}=3,6$ Hz, $J_{\text{H5-H6b}}=2,0$ Hz, 1H, H-5); 3,72 (dd, $J_{\text{H6a-H6b}}=12,4$ Hz, $J_{\text{H6a-H5}}=1,2$ Hz, 1H, H-6a); 3,61 (dd, $J_{\text{H6b-H6a}}=12,8$ Hz, $J_{\text{H6b-H5}}=4,4$ Hz, 1H, H-6b); 3,43 (s, 3H, OMe); 2,09 (s, 3H, OAc); 2,07 (s, 3H, OAc); 2,03 (s, 3H, OAc) ppm
^{13}C -RMN (CDCl_3)	δ : 170,5 (CO, OAc); 170,3 (CO, OAc); 170,2 (CO, OAc); 96,7 (C-1); 71,0 (C-2); 70,0 (C-4); 69,4 (C-5); 68,8 (C-3); 60,9 (C-6); 55,4 (CH_3 , OMe); 20,7 (CH_3 , OAc); 20,7 (CH_3 , OAc); 20,7 (CH_3 , OAc) ppm

3.5.4 Tosilação do Grupo Hidroxilo em C-6

3.5.4.1 Procedimento

Num balão apropriado foram dissolvidos o composto 2,3,4-tri-*O*-acetil- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**20**) (0,931 g; 0,0029 mol) e 1,2 eq. (0,666 g; 0,0035 mol) de cloreto de tosilo (TsCl), em 20 mL de piridina, sob atmosfera inerte. A mistura foi deixada a reagir durante dezasseis horas, sob agitação, à temperatura ambiente.

Ao fim de dezasseis horas de reação, verificou-se o progresso da reação por TLC, verificando-se que esta se encontrava quase completa, sendo adicionados mais 0,3 eq. (0,016 g) de TsCl e 5 mL de piridina.

A reação foi então colocada a reagir por mais quatro horas, sendo novamente verificado o progresso da reação por TLC, em que se verificou a presença do 2,3,4-tri-*O*-acetil-6-*O*-tosil- α -D-glucopiranosídeo de metilo **21**, sendo depois realizada a evaporação da piridina no evaporador rotativo. Após a evaporação do solvente, foi realizada uma cromatografia em coluna para purificar o composto final, sendo o eluente usado uma mistura 1:1 (AcOEt:Et. Pet.).

A massa obtida do composto **21** foi de 0,147 g (0,000291 mol).

3.5.4.2 Caracterização

O composto **21** foi caracterizado por RMN, sendo os resultados obtidos concordantes com os encontrados na literatura.⁹

3.5.5 Introdução de um Grupo Azida em C-6

3.5.5.1 Procedimento

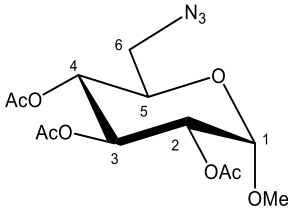
Num balão apropriado, foram dissolvidos 2,3,4-tri-O-acetil-6-O-tosil- α -D-glucopiranosídeo de metilo **21** (0,147 g, 0,000291 mol) e 3 eq. de Azida de sódio (0,062 g, 0,0087 mol), num volume apropriado de N,N-dimetilformamida (DMF), em atmosfera inerte. A mistura foi colocada dentro de uma tina de óleo, reagindo depois a 80 °C, sob agitação, durante dezasseis horas. Após dezasseis horas de reação, verificou-se por TLC a presença do composto **5** (2,3,4-tri-O-acetil-6-azida-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo).

Após a confirmação da presença do composto final, procedeu-se à evaporação do solvente, e à extração da fase orgânica. Para isso, o resíduo resultante da evaporação do solvente foi dissolvido em diclorometano, e lavado 3x com água destilada. As fases orgânicas foram depois secas com MgSO₄ anidro e concentradas no evaporador rotativo.

Após a extração, procedeu-se à purificação do composto final por cromatografia em coluna, usando como eluente uma mistura 1:3 (AcOEt:Et. Pet.).

A massa obtida do composto **5** foi de 0,375 g (0,000266 mol).

3.5.5.2 Caracterização

Nome	2,3,4-tri-O-acetil-6-azida-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo (5)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₁₃ H ₁₉ O ₈ N ₃
Massa Molecular	345,31 g/mol
R _f	0,68 (1:1, AcOEt:n-Hex)
¹ H-RMN (CDCl ₃)	δ: 5,47 (dd aprox. t, J _{H3-H4} =J _{H2-H3} =10,0 Hz, 1H, H-3); 5,00 (t, J _{H4-H3} =J _{H4-H5} =10,0 Hz, 1H, H-4); 4,98 (d, J _{H1-H2} =3,6 Hz, 1H, H-1); 4,88 (dd, J _{H2-H3} =10,0 Hz; J _{H2-H1} =3,6 Hz, 1H, H-2); 3,97 (ddd, J _{H5-H4} = 10,0 Hz, J _{H5-H6b} = 6,4 Hz, J _{H5-H6a} = 2,4 Hz, 1H, H-5); 3,45 (s, 3H, OMe); 3,38-3,28 (m, 2H, H-6a/H-6b); 2,08 (s, 3H, OAc); 2,04 (s, 3H, OAc); 2,01 (s, 3H, OAc) ppm
¹³ C-RMN (CDCl ₃)	δ: 170,0 (CO, OAc); 170,0 (CO, OAc); 169,6 (CO, OAc); 96,6 (C-1); 70,7 (C-2); 69,8 (C-3); 69,7 (C-4); 68,5 (C-5); 55,5 (CH ₃ , OMe); 50,9 (C-6); 20,7 (CH ₃ , OAc); 20,6 (CH ₃ , OAc); 20,6 (CH ₃ , OAc) ppm

3.6 Acoplamento dos Compostos (1), (2), (3) e (4) ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5)

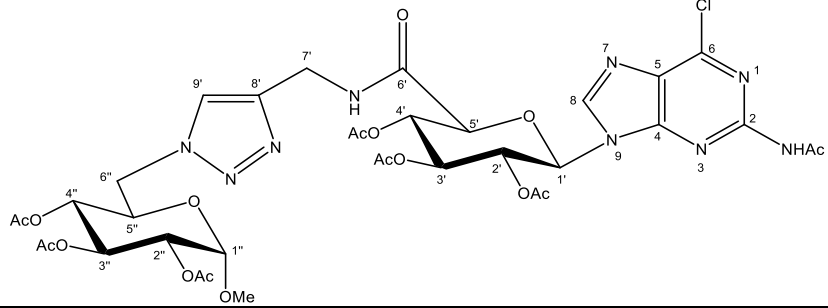
3.6.1 Acoplamento do Composto 1 ao 6-Azido Glucósido de Metilo (5)

3.6.1.1 Procedimento

A uma solução de *N*-propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-9-il)-2,3,4-tri-*O*-acetil- β -D-glucopiruranonamida (**1**, 85 mg, 0,0000692 mol) em diclorometano (20 mL) e 2,3,4-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**5**, 53 mg, 0,0000692 mol), foi adicionado CuI/Amberlyste A-21 (150 mg), tendo a mistura reagido durante 3,5 dias.

Ao final de 3,5 dias de reação, e verificação do progresso da reação por TLC, o catalisador foi filtrado e o solvente evaporado no evaporador rotativo. O resíduo resultante foi então sujeito a uma cromatografia em coluna com o solvente obtendo-se o composto **6** (62 mg, 45%) na forma de cristais amarelos.

3.6.1.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -[1-(metil-2,3,4- <i>O</i> -acetil-6-desoxi- α -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil-1-(2-acetamido-6-cloro-purin-9-il)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiruranonamida (6)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	896,22 g/mol
R _f	0,43 (9:1, AcOEt:MeOH)
¹ H-RMN (MeOD)	δ : 8,70 (s, 1H, H-8); 7,96 (s, 1H, H-9'); 6,40 (dl, $J_{H1'-H2'} = 9,2$ Hz, 1H, H-1'); 5,80 (t, $J_{H2'-H1'} = J_{H2'-H3'} = 9,6$ Hz, 1H, H-2'); 5,61 (t, $J_{H3'-H2'} = J_{H3'-H2''} = 9,6$ Hz, 1H, H-3'); 5,38* (t, $J_{H4'-H3'} = J_{H4'-H5'} = 9,6$ Hz, 1H, H-4'); 5,37* (t, $J_{H3''-H2''} = J_{H3''-H4''} = 9,6$ Hz, 1H, H-3''); 4,87 (d, $J_{H1''-H2''} = 3,6$ Hz, H-1''); 4,82 (dd, $J_{H2''-H3''} = 10$ Hz, $J_{H2''-H1''} = 3,6$ Hz, H-2''); 4,77 (t, $J_{H4''-H3''} = J_{H4''-H5''} = 9,6$ Hz, 1H, H-4''); 4,63-4,36 (m, 5H, H-5', H-6'', H-7'); 4,18 (ddd, $J_{H5''-H4''} = 10$ Hz, $J_{H5''-H6''} = 6,4$ Hz, $J_{H5''-H6''} = 3,6$ Hz, 1H, H-5''); 3,15 (s, 3H, OMe); 2,29 (s, 3H, NHAc); 2,06 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,05 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,04 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,02 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 1,97 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 1,77 (s, 3H, CH ₃ , OAc) ppm *sobreposição com composto 2
¹³ C-RMN (MeOD)	δ : 171,7, 171,6, 171,3, 171,2, 171,1, 170,7 (6 \times CO, OAc), 168,4 (CO, NHAc); 145,9 (C-8); 98,0 (C-1''); 72,1 (C-2''); 71,7 (C-3''); 71,4 (C-4''); 71,3 (C-4'); 68,9 (C-5''); 55,9 (OMe); 51,5 (C-6''); 35,4 (C-7'); 24,7 (NHAc); 20,6, 20,6, 20,5 (6 \times CH ₃ , OAc) ppm

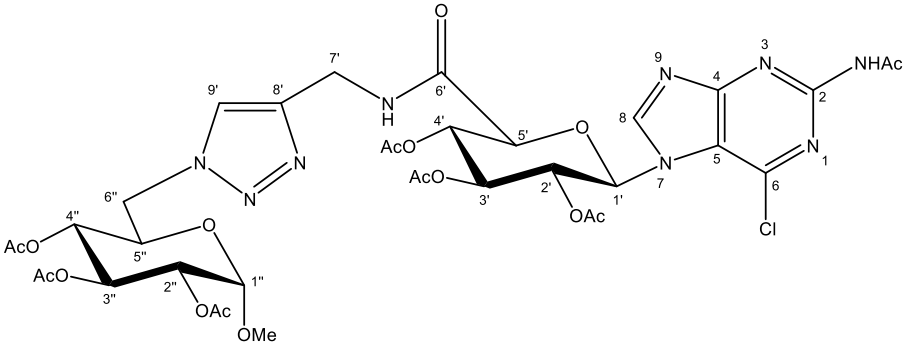
3.6.2 Acoplamento do Composto **2** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

3.6.2.1 Procedimento

A uma solução de *N*-propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-7-il)-2,3,4-tri-*O*-acetil- β -D-glucopiruranuronamida (**2**, 70 mg, 0,000126 mol) em diclorometano (10 mL) e 2,3,4-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**5**, 44 mg, 0,000126 mol), foi adicionado CuI/Amerlyste A-21 (150 mg), tendo a mistura reagido durante 40 horas.

Ao final de 40 horas de reação, e verificação do progresso da reação por TLC, o catalisador foi filtrado e o solvente evaporado no evaporador rotativo. O resíduo resultante foi então sujeito a uma cromatografia em coluna com o solvente obtendo-se o composto **7** (69 mg, 61%) na forma de cristais amarelos.

3.6.2.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -[1-(metil-2,3,4- <i>O</i> -acetil-6-desoxi- α -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil-1-(2-acetamido-6-cloro-purin-7-il)-2,3,4-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucopiruranuronamida (7)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	896,22 g/mol
R _f	0,43 (9:1, AcOEt:MeOH)
¹ H-RMN (MeOD)	δ : 8,99 (sl, 1H, H-8); 7,88 (s, 1H, H-9'); 6,40 (dl, 1H, H-1'); 5,81 (t, $J_{H2'-H1'}=J_{H2'-H3'}=9,2$ Hz, 1H, H-2'); 5,69 (t, $J_{H3'-H2'}=J_{H3'-H2''}=9,2$ Hz, 1H, H-3'); 5,42* (t, $J_{H4'-H3'}=J_{H4'-H5'}=9,6$ Hz, 1H, H-4'); 5,37* (t, $J_{H3''-H2''}=J_{H3''-H4''}=9,6$ Hz, 1H, H-3''); 4,88** (sl, 1H, H-1''); 4,84 (dd, $J_{H2''-H3''}=10$ Hz, $J_{H2''-H1''}=3,6$ Hz, H-2''); 4,78 (t, $J_{H4''-H3''}=J_{H4''-H5''}=9,6$ Hz, 1H, H-4''); 4,58-4,36 (m, 5H, H-5', H-6''a/b, H-7'a/b); 4,19 (ddd, $J_{H5''-H4''}=10$ Hz, $J_{H5''-H6''a}=6,4$ Hz, $J_{H5''-H-6''b}=3,6$ Hz, 1H, H-5''); 3,18 (s, 3H, OMe); 2,30 (sl, 3H, NHAc); 2,06 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,04 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,03 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 2,02 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 1,97 (s, 3H, CH ₃ , OAc), 1,83 (s, 3H, CH ₃ , OAc) ppm *Sobreposição **Sobreposição com sinal de H ₂ O
¹³ C-RMN (MeOD)	δ : 171,7, 171,6, 171,3, 171,2, 171,2, 170,7 (6 \times CO, OAc), 168,3 (CO, NHAc); 125,9 (C-9'); 98,1 (C-1''); 76,0 (C-5'), 73,4 (C-3'); 72,1 (C-4'); 71,7 (C-2'); 71,4 (C-2''); 71,0 (C-3''); 70,4 (C-4''); 68,8 (C-5''); 56,0 (OMe); 51,5 (C-6''); 35,4 (C-7'); 24,7 (CH ₃ , NHAc); 20,7, 20,7, 20,6, 20,5, 20,5, 20,1 (6 \times CH ₃ , OAc) ppm

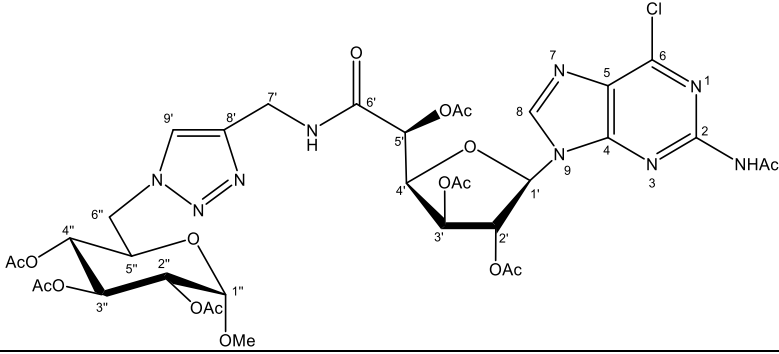
3.6.3 Acoplamento do Composto **3** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

3.6.3.1 Procedimento

A uma solução de *N*-propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-9-il)-2,3,5-tri-*O*-acetil- β -D-glucofuranuronamida (**3**, 21 mg, 0,000038 mol) em diclorometano (6 mL) e 2,3,4-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**5**, 15 mg, 0,000038 mol), foi adicionado CuI/Amberlyste A-21 (20 mg), tendo a mistura reagido durante 16 horas.

Ao final de 16 horas de reação, e verificação do progresso da reação por TLC, o catalisador foi filtrado e o solvente evaporado no evaporador rotativo. O resíduo resultante foi então sujeito a uma cromatografia em coluna com o solvente obtendo-se o composto **8** (25 mg, 73%) na forma de cristais amarelos.

3.6.3.2 Caracterização

Nome	<i>N</i> -[1-(metil-2,3,4- <i>O</i> -acetil-6-desoxi- α -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil-1-(2-acetamido-6-cloro-purin-9-il)-2,3,5-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucofuranuronamida (8)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	896,22 g/mol
R _f	0,64 (9:1, AcOEt:MeOH)
¹ H-RMN (MeOD)	δ : 8,55 (s, 1H, H-8); 7,78 (s, 1H, H-9'); 6,46 (d, $J_{H1'-H2'}=1$ Hz, 1H, H-1'); 5,66 (d, $J_{H3'-H4'}=4,0$ Hz, 1H, H-3'); 5,63 (sl, 1H, H-2'); 5,35 (dd aprox. t*, $J_{H-3''-H-4''}=10,8$ Hz, 1H, H-3''); 5,33 (d*, $J_{H5'-H4'}=9,2$ Hz, 1H, H-5'); 4,81 (d*, 1H, H-1''); 4,81 (dd*, $J_{H-2''-H3''}=10,8$ Hz; $J_{H-2''-H1''}=3,6$ Hz, 1H, H-2''); 4,74 (dd aprox. t*, $J_{H4''-H3''}=J_{H4''-H5''}=9,8$ Hz, 1H, H-4''); 4,71 (dd*, $J_{H4'-H3'}=4,0$ Hz; $J_{H4'-H5'}=8,8$ Hz, 1H, H-4'); 4,57-4,47 (m, $J_{H-6a''-H-6b''}=14,0$ Hz; $J_{H-6a''-H-5''}=7,2$ Hz, 2H, H-6a''/H-6b''); 4,46-4,43 (m, 2H, H-7a'/H-7b'); 4,13 (ddd, $J_{H5''-H4''}=10$ Hz; $J_{H5''-H6a''}=7,2$ Hz; $J_{H5''-H6b''}=4,0$ Hz, 1H, H-5''); 3,13 (s, 3H, OCH ₃); 2,30 (s, 3H, NHAc); 2,15 (s, 3H, OAc); 2,09 (s, 3H, OAc); 2,08 (s, 3H, OAc); 2,05 (s, 3H, OAc); 2,01 (s, 3H, OAc); 1,97 (s, 3H, OAc); 1,96 (s, 3H, OAc) ppm *Sobrepuestos
¹³ C-RMN (MeOD)	δ : 172,2 (CQ, NHAc); 171,7 (CQ, OAc); 171,5 (CQ, OAc); 171,3 (CQ, OAc); 171,0 (CQ, OAc); 170,9 (CQ, OAc); 170,2 (CQ, OAc); 169,6 (C-6'); 153,9 (C-6/C-2); 153,4 (C-4); 151,8 (C-2/C-6); 145,2 (C-8); 128,9 (C-5); 125,7 (C-9'); 98,0 (C-1''); 89,3 (C-1'); 81,0 (C-4'); 80,5 (C-2'); 74,8 (C-3'); 71,4 (C-2''); 71,1 (C-3''); 71,0 (C-4''); 68,8 (C-5''); 55,9 (OCH ₃); 51,6 (C-6''); 35,7 (C-7'); 24,8 (CH ₃ NHAc); 20,7, 20,6, 20,5 (6 x CH ₃ OAc) ppm

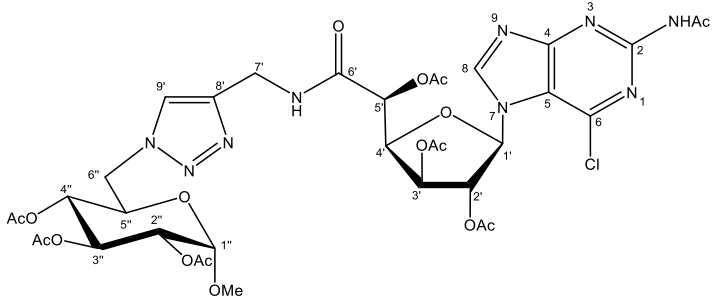
3.6.4 Acoplamento do Composto **4** ao 6-Azido Glucósido de Metilo (**5**)

3.6.4.1 Procedimento

A uma solução de *N*-propargil-1-(2-acetamido-6-cloropurin-7-il)-2,3,5-tri-*O*-acetil- β -D-glucofuranuronamida (**4**, 30 mg, 0,000054 mol) em diclorometano (8 mL) e 2,3,4-*O*-acetil-6-azido-6-desoxi- α -D-glucopiranosídeo de metilo (**5**, 19 mg, 0,000054 mol), foi adicionado CuI/Amberlyste A-21 (100 mg), tendo a mistura reagido durante 88 horas.

Ao final de 88 horas de reação, e verificação do progresso da reação por TLC, o catalisador foi filtrado e o solvente evaporado no evaporador rotativo. O resíduo resultante foi então sujeito a uma cromatografia em coluna com o solvente obtendo-se o composto **9** (12 mg, 25%) na forma de cristais amarelos.

3.6.4.2 Caracterização

Nome	N-[1-(metil-2,3,4- <i>O</i> -acetil-6-desoxi- α -D-glucopiranosid-6-il)-1H-1,2,3-triazol-4-il]metil-1-(2-acetamido-6-cloro-purin-7-il)-2,3,5-tri- <i>O</i> -acetil- β -D-glucofuranuronamida (9)
Estrutura com numeração de átomos	
Fórmula Química	C ₃₅ H ₄₂ ClN ₉ O ₁₇
Massa Molecular	896,22 g/mol
R _f	0,23 (9:1, AcOEt:MeOH)
¹ H-RMN (MeOD)	δ : 8,89 (sl, 1H, H-8); 7,85 (s, 1H, H-9'); 6,70 (sl, 1H, H-1'); 5,60 (d, $J_{H3'-H4'}=3,2$ Hz, 1H, H-3'); 5,56 (sl, 1H, H-2'); 5,33 (t, $J_{H-3''-H-4''}=J_{H-3''-H-2''}=9,6$ Hz, 1H, H-3''); 5,31 (d, $J_{H5'-H4'}=8,6$ Hz, 1H, H-5'); 4,84* (d, $J_{H1''-H2''}=3,6$ Hz, 1H, H-1''); 4,81* (dd, $J_{H2''-H3''}=12,8$ Hz; $J_{H2''-H1''}=4,4$ Hz, H-2''); 4,78* (dd, $J_{H4'-H5'}=8,6$ Hz; $J_{H4'-H3'}=3,2$ Hz, 1H, H-4'); 4,73 (t, $J_{H4''-H3''}=J_{H4''-H5''}=9,6$ Hz, 1H, H-4''); 4,57-4,44 (m, 4H, H-6''/H-7''); 4,16 (ddd, $J_{H5''-H4''}=10$ Hz; $J_{H5''-H6a''}=6,4$ Hz; $J_{H5''-H6b''}=3,2$ Hz, 1H, H-5''); 3,17 (s, 3H, OMe); 2,31 (sl, 3H, NHAc); 2,21 (s, 3H, OAc); 2,10 (s, 3H, OAc); 2,04 (s, 3H, OAc); 2,01 (s, 3H, OAc); 2,00 (s, 3H, OAc); 1,96 (s, 3H, OAc) ppm *Sobrepostos
¹³ C-RMN (MeOD)	δ : 172,2 (CQ; NHAc); 171,7 (CQ, OAc); 171,6 (CQ, OAc); 171,3 (CQ, OAc); 171,0 (CQ, OAc); 170,6 (CQ, OAc); 169,9 (CQ, OAc); 169,6 (C-6'); 146,0 (C-8'); 125,3 (C-9'); 97,9 (C-1''); 92,0 (C-1'); 82,2 (C-4'); 81,0 (C-2'); 74,6 (C-3'); 71,8 (C-2''); 70,9 (C-3''); 70,8 (C-4''); 68,8 (C-5''); 56,0 (OMe); 51,5 (C-6''); 35,8 (C-7'); 24,6 (CH ₃ NHAc); 20,7, 20,6, 20,5 (6 x CH ₃ OAc) ppm

3.7 Manutenção da Cultura Celular

3.7.1 Introdução à Linha Celular MDA-MB-231

Nesta dissertação foram usadas células da linha celular MDA-MB-231, linha celular de adenocarcinoma maligno, estabelecida a partir de uma única amostra de efusão pleural recolhida a 17 de outubro de 1973 de uma paciente caucasiana de 51 anos.⁵⁷⁻⁵⁹ Anteriormente, foi submetida a quimioterapia combinada (ciclofosfamida, doxorrubicina e metotrexato) não obtendo melhorias. Após a recolha da amostra, o prognóstico da paciente piorou, sendo o óbito declarado a 13 de janeiro de 1974.⁵⁸

A linha MDA-MB-231 é uma linha celular muito agressiva e invasiva, sendo ainda considerada uma linha celular de cancro da mama triplo negativo (TNBC), devido à ausência de três marcadores moleculares, sendo eles a expressão dos recetores de estrogénio e progesterona; e a amplificação do recetor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2).⁵⁹⁻⁶¹ A sua morfologia é do tipo endotelial, possuindo um fenótipo invasivo, caracterizado pela existência de extensões estreladas, que ligam várias colónias celulares (Figura 3.1).⁶¹

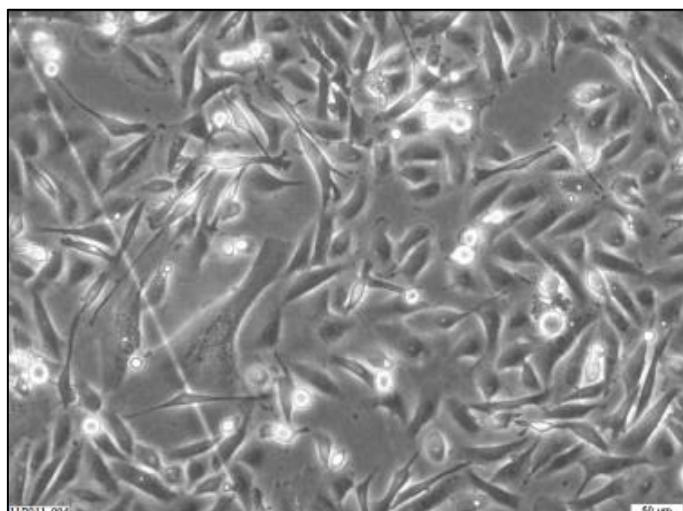


Figura 3.1 - Fotografia retirada a uma cultura celular da linha celular MDA-MB-231, onde se pode verificar a existência das extensões estreladas características desta linha celular (adaptada de ⁵⁹).

3.7.2 Procedimentos e Manutenção da Cultura Celular

A linha celular de adenocarcinoma maligno MDA-MB-231 foi mantida em incubação dentro de frascos de cultura, à temperatura de 37°C numa atmosfera controlada contendo 5% de CO₂.

O meio de cultura usado para manutenção da linha celular é constituído por DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina, e 1% de penicilina/estreptomicina.

A manutenção das culturas foi realizada com uma periodicidade variada, dependendo da velocidade de proliferação das células, variando entre 2 dias a 7 dias, sendo realizada quando as células apresentavam um nível de confluência de aproximadamente 80%.

A cada subcultivagem é necessária a remoção das células do frasco de cultura, sendo utilizada uma solução de Tripsina/EDTA 1x, de forma a desaderir as células do fundo do frasco.

Mais especificamente, este procedimento inicia-se com a remoção do meio de cultura, seguida de lavagem com uma solução de PBS 1x, seguida de incubação das células a 37°C, por um período máximo de 5 minutos, com a adição de Tripsina/EDTA 1x.

O sedimento celular resultante é depois re-suspenso num volume de meio 10x superior, de forma a inativar a ação da tripsina, e recolhido para posterior centrifugação, durante 5 min a 1200 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante é recolhido. Por fim, procede-se a nova cultivagem das células no frasco de cultura.

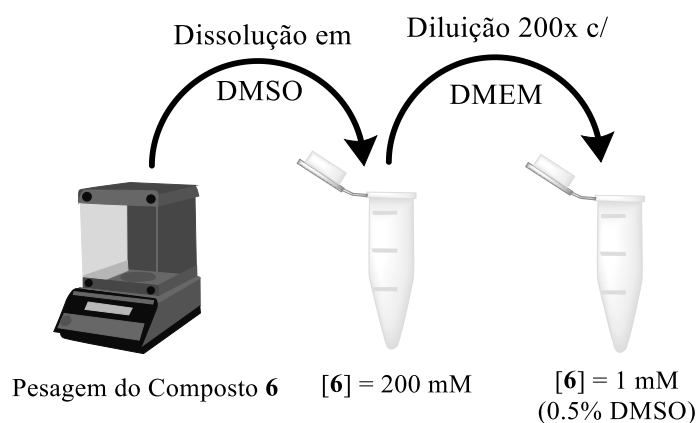
À data de obtenção das células, estas foram avaliadas quanto a uma possível contaminação com Mycoplasma, tendo-se obtido resultados negativos.

3.8 Ensaios de Solubilidade do Composto 6

Os 4 compostos sintetizados, devido à ausência de grupos hidroxilo livres, são pouco solúveis em água, impossibilitando a sua dissolução direta em matrizes aquosas, logo procurou-se uma estratégia de forma a permitir a dissolução deste tipo de compostos em meios aquosos. Em trabalhos anteriores realizados no Grupo de Glicoimunologia, em que esta problemática também se aplicou, embora aplicada a compostos diferentes, foi usado DMSO como co-solvente, pois este solubilizava os compostos pretendidos à concentração pretendida.⁵⁴

3.8.1 Estratégia de Solubilização do Composto 6

A 1 mg de composto 6, foram adicionados 5,6 µL de DMSO, obtendo-se assim uma solução stock com uma concentração de 0,2 M. A solução foi então diluída 200x em DMEM, obtendo-se assim uma solução final de trabalho com uma concentração de composto 6 de 1 mM e uma percentagem de 0,5% de DMSO (Esquema 3.1).



Esquema 3.1 - Representação esquemática da estratégia de dissolução do composto 6.

3.9 Ensaios de Viabilidade Celular com o Composto 7

A cultivagem das células para a realização dos ensaios de viabilidade celular inicia-se com a planificação dos poços e das condições a testar na placa de cultura. Após a planificação, é feita a cultivagem de um certo n^0 de células por poço, no decurso de uma subcultivagem da cultura principal. O n^0 de células semeadas por poço deve ser tal que permita um nível elevado de confluência (cerca de 90%-95%) passado 24h da sua cultivagem.

De forma a avaliar a viabilidade celular do composto 7, foram usados dois métodos distintos, sendo eles o método de exclusão com azul tripano e a observação fotográfica.

3.9.1 Método de Exclusão com Azul Tripano

O método de exclusão com azul tripano consiste na aplicação do corante azul tripano (di-2,7-sulfonato tetrasódico de (3Z)-5-amino-3-[[4-[4-[(2Z)-2-(8-amino-1-oxo-3,6-disulfonato-naftalen-2-ídeno)hidrazinil]-3-metilfenil]-2-metilfenil]hidrazinilideno]-4-oxonaftaleno) (Figura 3.2) sobre células em suspensão ou em células aderidas, e a sua observação.

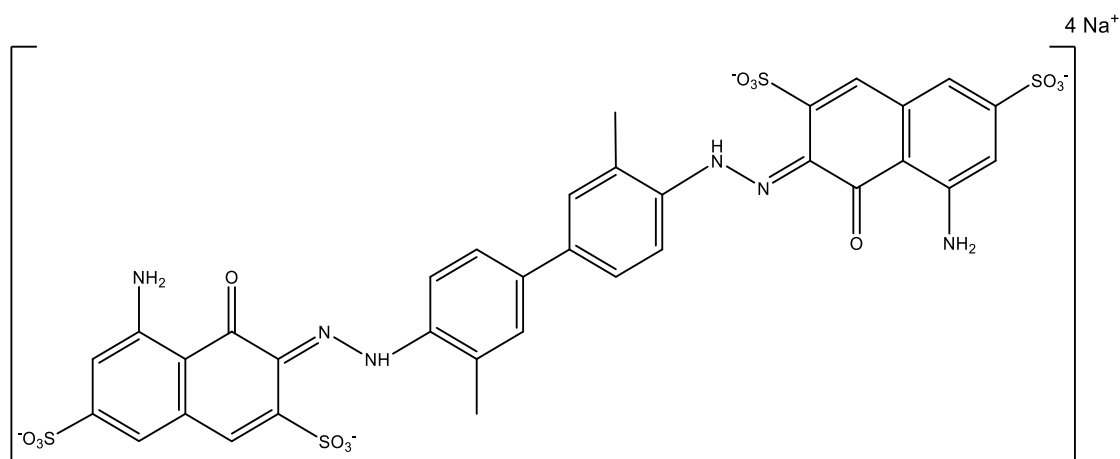


Figura 3.2 - Estrutura química do corante azul tripano na sua forma ionizada.

Este método de determinação da viabilidade celular baseia-se no princípio que as células viáveis possuem membranas celulares intactas, excluindo certos corantes como o azul tripano, ao passo que as células mortas ou inviáveis não excluem, ficando assim coradas.⁶²

Mais concretamente, este método consiste na recolha inicial do meio das células em cultura, seguindo-se uma lavagem do poço com uma solução de PBS. Após esta lavagem, segue-se a tripsinização das células do poço e re-suspensão, num volume mais pequeno, com o meio usado anteriormente, de forma a obter um resultado mais correto. Finalmente, existe a aplicação da solução de azul tripano, na proporção 1:2, e, subsequentemente a sua observação e contagem com recurso a um microscópio e a um hemocítmetro.

Devido à baixa reprodutibilidade dos resultados obtidos nas contagens celulares, procedeu-se à aplicação da solução de azul tripano sobre as células ainda aderidas, havendo a remoção de parte do meio antes da aplicação do corante. Esta variação no protocolo do método, salta o passo da tripsinização das células do poço e impede a contagem das células no hemocítmetro, sendo que a avaliação da viabilidade celular passa a ser efetuada por uma análise visual das células presentes no fundo dos poços.

3.9.2 Método de Observação Fotográfica das Células

O método de observação fotográfica das células baseia-se na observação de células MDA-MB-231 em cultura.

No decurso destes ensaios foram usadas duas variações deste método: uma variante que não contém o composto **7**, usada como prova de conceito, e uma variante em que o composto **7** é usado.

O procedimento usado é semelhante nas duas variantes deste método. Este método consiste na observação das subculturas celulares num microscópio que contenha uma câmara fotográfica acoplada. Estas fotografias podem ser retiradas no momento em que existe a mudança do meio de cultura e após o período de incubação preestabelecido.

No caso da primeira variante, as fotografias foram retiradas apenas no final das 24h de incubação. No caso da segunda variante, as fotografias foram retiradas antes da mudança de meio e no fim do período de incubação.

A ampliação das fotos tiradas foram de 40x, de forma a se obter uma visão geral do poço, e de 100x, de forma a se observar uma região de forma mais pormenorizadamente.

Capítulo 4 – Conclusões e Perspetivas Futuras

Em primeiro lugar, relativamente à síntese dos quatro análogos de açúcares de nucleósido difosfato pretendidos, possuindo o grupo (triazolil)metil amida como mimético do grupo difosfato, podemos concluir que a sua síntese foi bem-sucedida, pois foi possível a síntese de todos os análogos.

A síntese dos dois tipos de precursores, necessários ao acoplamento final pela cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen foi realizada de forma análoga ao que foi realizado anteriormente no grupo e publicado na literatura, obtendo-se rendimentos semelhantes aos reportados anteriormente.

No caso das reações de nucleosidação, os rendimentos foram superiores para a obtenção de nucleósidos de furanosilo, em comparação com os nucleósidos de piranosilo, o que indica uma necessidade de otimização das condições reacionais para os derivados de piranosilo.

Por outro lado, as reações de acoplamento do tipo cicloadição 1,3-dipolar de Huisgen foram conduzidas com rendimentos de moderados a bons (entre 25 a 73%).

Em segundo lugar, foi testada a solubilização do composto **6** em meio biológico, de forma a poder ser avaliado quanto ao seu possível efeito citotóxico. Como este se encontra totalmente protegido, não possuindo grupos hidroxilo livres, a solubilidade em meios aquosos é naturalmente baixa. De forma a contornar este problema, foi testada a co-solubilização com DMSO, verificando-se a solubilização do composto **6** numa solução de meio de cultura contendo até 0,5% de DMSO.

Em terceiro lugar, foi avaliado o possível efeito citotóxico do composto **7**, o único que pôde ser testado no âmbito desta dissertação, em células de adenocarcinoma mamário da linha MDA-MB-231. Para isso, foram utilizadas duas técnicas de simples aplicação, a exclusão celular com azul tripano e a observação fotográfica da morfologia celular.

De forma a conservar uma maior massa de composto, a utilização do composto **7** foi restringida apenas aos ensaios por observação fotográfica. A constrição temporal e as limitações na aplicação do método de exclusão com azul tripano, são dois fatores apontados como motivos para esta decisão.

O efeito citotóxico do composto **7** foi avaliado à concentração de 1 mM, não obtendo um efeito significativo na diminuição da viabilidade celular. Os resultados obtidos nestes ensaios revelam semelhanças com ensaios que foram realizados sem a presença do composto **7**. Posteriormente, prevê-se o uso de outras técnicas de avaliação da viabilidade celular, nomeadamente o uso da resazurina (Presto Blue™) como corante de exclusão, permitindo uma avaliação quantitativa da viabilidade celular.

Em suma, os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade para o composto **7** apontam para um baixo efeito citotóxico deste tipo de compostos.

No entanto, uma ligeira modificação no modo de ligação do grupo mimético do grupo difosfato ao monossacárido, nomeadamente através do carbono anomérico deste, poderá tornar este tipo de compostos mais semelhante aos outros análogos já reportados. De forma a confirmar esta hipótese, uma abordagem útil seria a realização de ensaios de *docking* molecular ou de estudos de interação contra glicosiltransferases já conhecidas.

Em suma, nesta dissertação de mestrado, foram desenvolvidos compostos contendo uma estrutura inovadora potencialmente mimética dos substratos de glicosiltransferases usando uma abordagem sintética eficaz através de uma via convergente. Estes resultados motivam futura investigação tendo

como base moléculas deste tipo, incluindo otimização estrutural, síntese de outros análogos e estudos biológicos em glicosiltransferases ou outros alvos relevantes.

Capítulo 5 – Bibliografia

- (1) Pinho, S. S.; Reis, C. A. Glycosylation in Cancer: Mechanisms and Clinical Implications. *Nat Rev Cancer* **2015**, *15* (9), 540–555.
- (2) Stowell, S. R.; Ju, T.; Cummings, R. D. Protein Glycosylation in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2015**, *10* (1), 473–510.
- (3) Marth, J. D.; Grewal, P. K. Mammalian Glycosylation in Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8* (11), 874–887.
- (4) Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V. Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13* (7), 448–462.
- (5) Munkley, J.; Elliott, D. J. Hallmarks of Glycosylation in Cancer. *Oncotarget* **2016**, *7* (23), 1–12.
- (6) Silva, Z.; Videira, P. A. Glicoimunologia: Uma Janela de Desafios e Oportunidades Para Uma Imunologia Mais Doce. *Bol. da Soc. Port. Química* **2017**, *41* (147), 233–239.
- (7) Carrascal, M. Role of Sialylated Glycans in Cancer Progression : Sialyl-Tn and Sialyl-LewisX - Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências Médicas - Universidade Nova de Lisboa, 2017.
- (8) Tedaldi, L.; Wagner, G. K. Beyond Substrate Analogues: New Inhibitor Chemotypes for Glycosyltransferases. *Medchemcomm* **2014**, *5* (8), 1106.
- (9) Xavier, N.; Lucas, S.; Jorda, R.; Schwarz, S.; Loesche, A.; Csuk, R.; Oliveira, M. Synthesis and Evaluation of the Biological Profile of Novel Analogues of Nucleosides and of Potential Mimetics of Sugar Phosphates and Nucleotides. *Synlett* **2015**, *26* (19), 2663–2672.
- (10) Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D. *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed.; Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Davill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., et al., Eds.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2017.
- (11) Loureiro, L.; Carrascal, M.; Barbas, A.; Ramalho, J.; Novo, C.; Delannoy, P.; Videira, P. Challenges in Antibody Development against Tn and Sialyl-Tn Antigens. *Biomolecules* **2015**, *5* (3), 1783–1809.
- (12) Brenda. Information on EC 2.4.1.255 - protein O-GlcNAc transferase <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=2.4.1.255> (accessed Jun 15, 2018).
- (13) Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed.; W. H. Freeman: New York City, 2005.
- (14) Davis, B. G.; Fairbanks, A. J. *Carbohydrate Chemistry*, 1st ed.; Davies, S. G., Compton, R. G., Evans, J., Gladden, L. F., Eds.; Oxford University Press: Oxford, 2002.
- (15) Lairson, L. L.; Henrissat, B.; Davies, G. J.; Withers, S. G. Glycosyltransferases: Structures, Functions, and Mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77* (1), 521–555.
- (16) Jordheim, L. P.; Durantel, D.; Zoulim, F.; Dumontet, C. Advances in the Development of Nucleoside and Nucleotide Analogues for Cancer and Viral Diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12* (6), 447–464.
- (17) Seibel, J.; Jördening, H.-J.; Buchholz, K. Glycosylation with Activated Sugars Using Glycosyltransferases and Transglycosidases. *Biocatal. Biotransformation* **2006**, *24* (5), 311–342.
- (18) CASy. Carbohydrate Active Enzymes database www.cazy.org.
- (19) Lombard, V.; Golaconda Ramulu, H.; Drula, E.; Coutinho, P. M.; Henrissat, B. The

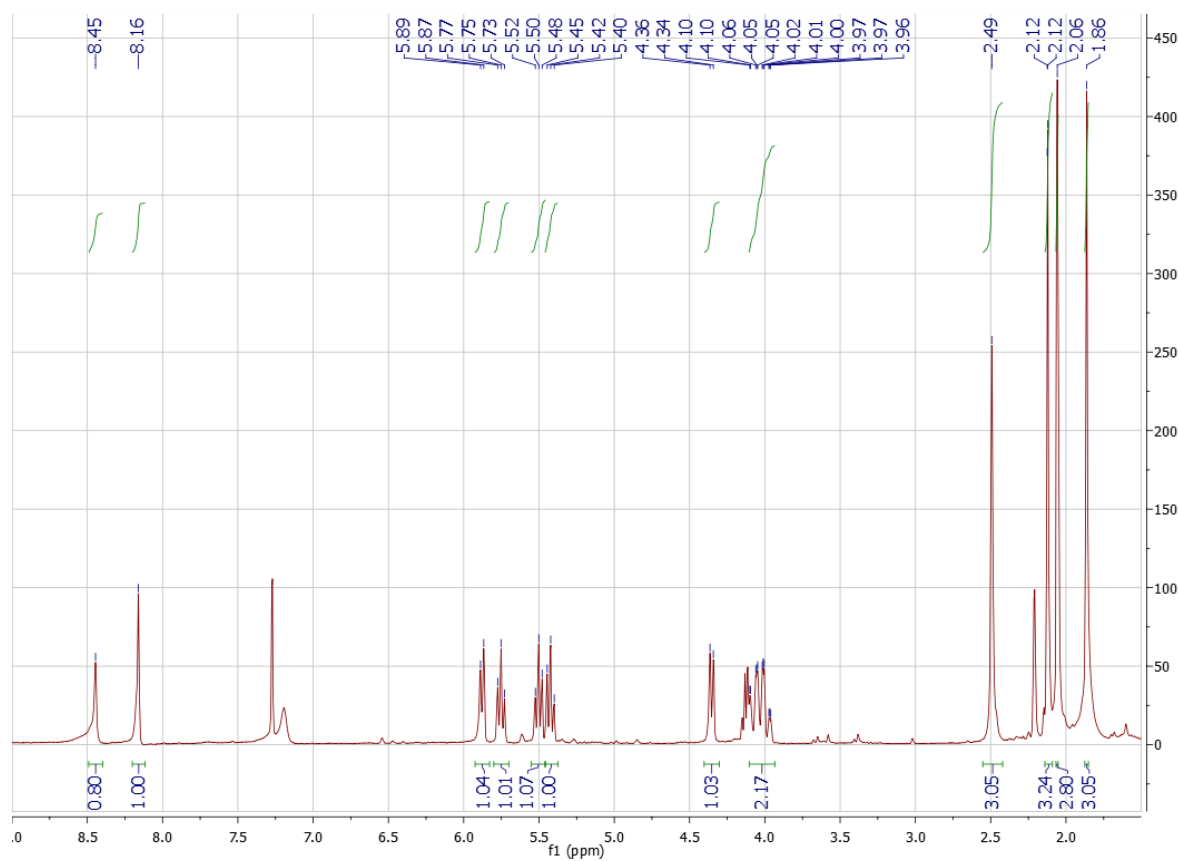
- Carbohydrate-Active Enzymes Database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42* (D1), D490–D495.
- (20) Chiu, C. P. C.; Watts, A. G.; Lairson, L. L.; Gilbert, M.; Lim, D.; Wakarchuk, W. W.; Withers, S. G.; Strynadka, N. C. J. Structural Analysis of the Sialyltransferase CstII from *Campylobacter* Jejuni in Complex with a Substrate Analog. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2004**, *11* (2), 163–170.
 - (21) Pak, J. E.; Arnoux, P.; Zhou, S.; Sivarajah, P.; Satkunarajah, M.; Xing, X.; Rini, J. M. X-Ray Crystal Structure of Leukocyte Type Core 2 B1,6- N- Acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (36), 26693–26701.
 - (22) PubChem. Vancomycin - C66H75Cl2N9O24
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14969> (accessed Aug 24, 2018).
 - (23) Koshland, D. E. Stereochemistry and the Mechanism of Enzymatic Reactions. *Biol. Rev.* **1953**, *28* (4), 416–436.
 - (24) Phillips, D. C. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 1967; Vol. 57, pp 484–495.
 - (25) Sinnott, M. L. Catalytic Mechanisms of Enzymic Glycosyl Transfer. *Chem. Rev.* **1990**, *90* (7), 1171–1202.
 - (26) Corfield, A. P. Mucins: A Biologically Relevant Glycan Barrier in Mucosal Protection. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2015**, *1850* (1), 236–252.
 - (27) Floor, S. L.; Dumont, J. E.; Maenhaut, C.; Raspe, E. Hallmarks of Cancer: Of All Cancer Cells, All the Time? *Trends Mol. Med.* **2012**, *18* (9), 509–515.
 - (28) Chiao, R. Y. Conceptual Tensions between Quantum Mechanics and General Relativity: Are There Experimental Consequences, e.g., Superconducting Transducers between Electromagnetic and Gravitational Radiation? *Cell* **2002**, *144* (5), 646–674.
 - (29) Carrascal, M. A.; Severino, P. F.; Guadalupe Cabral, M.; Silva, M.; Ferreira, J. A.; Calais, F.; Quinto, H.; Pen, C.; Ligeiro, D.; Santos, L. L.; et al. Sialyl Tn-Expressing Bladder Cancer Cells Induce a Tolerogenic Phenotype in Innate and Adaptive Immune Cells. *Mol. Oncol.* **2014**, *8* (3).
 - (30) Ferreira, J. A.; Videira, P. A.; Lima, L.; Pereira, S.; Silva, M.; Carrascal, M.; Severino, P. F.; Fernandes, E.; Almeida, A.; Costa, C.; et al. Overexpression of Tumour-Associated Carbohydrate Antigen Sialyl-Tn in Advanced Bladder Tumours. *Mol. Oncol.* **2013**, *7* (3), 719–731.
 - (31) IUPAC. IUPAC Gold Book - Nucleotides <http://goldbook.iupac.org/N04255.html> (accessed Jun 1, 2016).
 - (32) IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/naabb.html#intro> (accessed Jun 1, 2016).
 - (33) Chemical Abstracts Service. Naming and Indexing of Chemical Substances. In *Chemical Abstracts*; American Chemical Society: Columbus, 2008.
 - (34) Xavier, N. M. Recent Advances on Nucleotide Analogs and Mimetics. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*; Elsevier, 2017; pp 1–15.
 - (35) Schäfer, A.; Thiem, J. Synthesis of Novel Donor Mimetics of UDP-Gal, UDP-GlcNAc, and UDP-GalNAc as Potential Transferase Inhibitors. *J. Org. Chem.* **2000**, *65* (1), 24–29.
 - (36) Vembaiyan, K.; Pearcey, J. A.; Bhasin, M.; Lowary, T. L.; Zou, W. Synthesis of Sugar-Amino Acid-Nucleosides as Potential Glycosyltransferase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19* (1), 58–66.

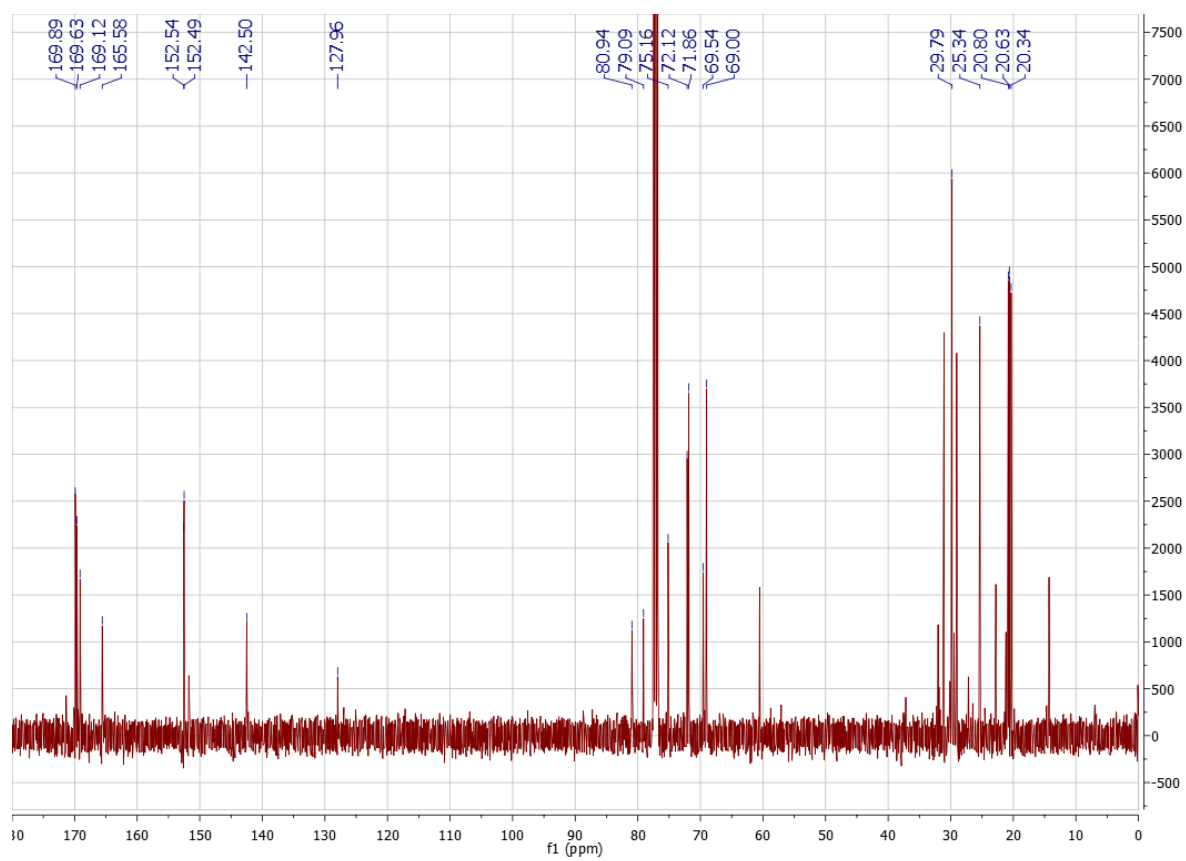
- (37) Niewiadomski, S.; Beebejaun, Z.; Denton, H.; Smith, T. K.; Morris, R. J.; Wagner, G. K. Rationally Designed Squaryldiamides – a Novel Class of Sugar-Nucleotide Mimics? *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (15), 3488.
- (38) Khaled, A.; Piotrowska, O.; Dominiak, K.; Augé, C. Exploring Specificity of Glycosyltransferases: Synthesis of New Sugar Nucleotide Related Molecules as Putative Donor Substrates. *Carbohydr. Res.* **2008**, 343 (2), 167–178.
- (39) Merino, P.; Delso, I.; Tejero, T.; Ghirardello, M.; Juste-Navarro, V. Nucleoside Diphosphate Sugar Analogues That Target Glycosyltransferases. *Asian J. Org. Chem.* **2016**, 5 (12), 1413–1427.
- (40) Compain, P.; Martin, O. R. Carbohydrate Mimetics-Based Glycosyltransferase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2001**, 9 (12), 3077–3092.
- (41) Izumi, M.; Yuasa, H.; Hashimoto, H. Bisubstrate Analogues as Glycosyltransferase Inhibitors. *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, 9 (1), 87–105.
- (42) Wang, R.; Steensma, D. H.; Takaoka, Y.; Yun, J. W.; Kajimoto, T.; Wong, C.-H. A Search for Pyrophosphate Mimics for the Development of Substrates and Inhibitors of Glycosyltransferases. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5 (4), 661–672.
- (43) Schmidt, R. R.; Frische, K. A New Galactosyl Transferase Inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, 3 (8), 1747–1750.
- (44) Vidal, S.; Bruyère, I.; Malleron, A.; Augé, C.; Praly, J.-P. Non-Isosteric C-Glycosyl Analogues of Natural Nucleotide Diphosphate Sugars as Glycosyltransferase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, 14 (21), 7293–7301.
- (45) Ghirardello, M.; de las Rivas, M.; Lacetera, A.; Delso, I.; Lira-Navarrete, E.; Tejero, T.; Martín-Santamaría, S.; Hurtado-Guerrero, R.; Merino, P. Glycomimetics Targeting Glycosyltransferases: Synthetic, Computational and Structural Studies of Less-Polar Conjugates. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, 22 (21), 7215–7224.
- (46) Wang, S.; Cuesta-Seijo, J. A.; Lafont, D.; Palcic, M. M.; Vidal, S. Design of Glycosyltransferase Inhibitors: Pyridine as a Pyrophosphate Surrogate. *Chem. - A Eur. J.* **2013**, 19 (45), 15346–15357.
- (47) Wang, S.; Shen, D. L.; Lafont, D.; Vercoutter-Edouart, A.-S.; Mortuaire, M.; Shi, Y.; Maniti, O.; Girard-Egrot, A.; Lefebvre, T.; Pinto, B. M.; et al. Design of Glycosyltransferase Inhibitors Targeting Human O-GlcNAc Transferase (OGT). *Medchemcomm* **2014**, 5 (8), 1172.
- (48) Martins, V. J. Síntese de Potenciais Compostos Miméticos de Açúcares de Nucleósido Difosfato - Relatório de Projeto de Licenciatura, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2016.
- (49) Dračinský, M.; Pohl, R. NMR Studies of Purines. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy*; Webb, G. A., Ed.; Elsevier Ltd, 2014; Vol. 82, pp 59–113.
- (50) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, 2 (10), 565–598.
- (51) Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1963**, 2 (11), 633–645.
- (52) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.
- (53) Girard, C.; Önen, E.; Aufort, M.; Beauvière, S.; Samson, E.; Herscovici, J. Reusable Polymer-Supported Catalyst for the [3+2] Huisgen Cycloaddition in Automation Protocols. *Org. Lett.* **2006**, 8 (8), 1689–1692.

- (54) de Almeida, J. F. Estudo Do Efeito Anti-Tumoral Dos Pró-Fármacos de Triazenos Em Linhas Celulares de Melanoma - Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2011.
- (55) Williams, H. D.; Trevaskis, N. L.; Charman, S. A.; Shanker, R. M.; Charman, W. N.; Pouton, C. W.; Porter, C. J. H. Strategies to Address Low Drug Solubility in Discovery and Development. *Pharmacol. Rev.* **2013**, 65 (1), 315–499.
- (56) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* **1997**, 62 (21), 7512–7515.
- (57) Center for Cancer Research - National Cancer Institute. MDA.MB.231 Cell Line Details https://strap.nci.nih.gov/cellline_detail.php?sample_id=2 (accessed Aug 20, 2018).
- (58) Cailleau, R.; Young, R.; Olive, M.; Reeves, W. J. Breast Tumor Cell Lines From Pleural Effusions. *J Natl Cancer Inst* **1974**, 53 (3), 661–674.
- (59) Public Health England. Cell Line Profile MDA-MB-231 <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/133182/mda-mb-231-cell-line-profile.pdf> (accessed Sep 24, 2018).
- (60) Chavez, K. J.; Garimella, S. V; Lipkowitz, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* **2010**, 32 (1–2), 35–48.
- (61) Kenny, P. A.; Lee, G. Y.; Myers, C. A.; Neve, R. M.; Semeiks, J. R.; Spellman, P. T.; Lorenz, K.; Lee, E. H.; Barcellos-Hoff, M. H.; Petersen, O. W.; et al. The Morphologies of Breast Cancer Cell Lines in Three-Dimensional Assays Correlate with Their Profiles of Gene Expression. *Mol. Oncol.* **2007**, 1 (1), 84–96.
- (62) Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, 2–3.

Capítulo 6 – Anexos

6.1 Espetros de RMN dos Compostos Sintetizados

6.1.1 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **1**6.1.1.1 ^1H -RMNFigura 6.1 - Espetro de ^1H -RMN do composto **1**.

6.1.1.2 ^{13}C -RMNFigura 6.2 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **1**.

6.1.1.3 COSY

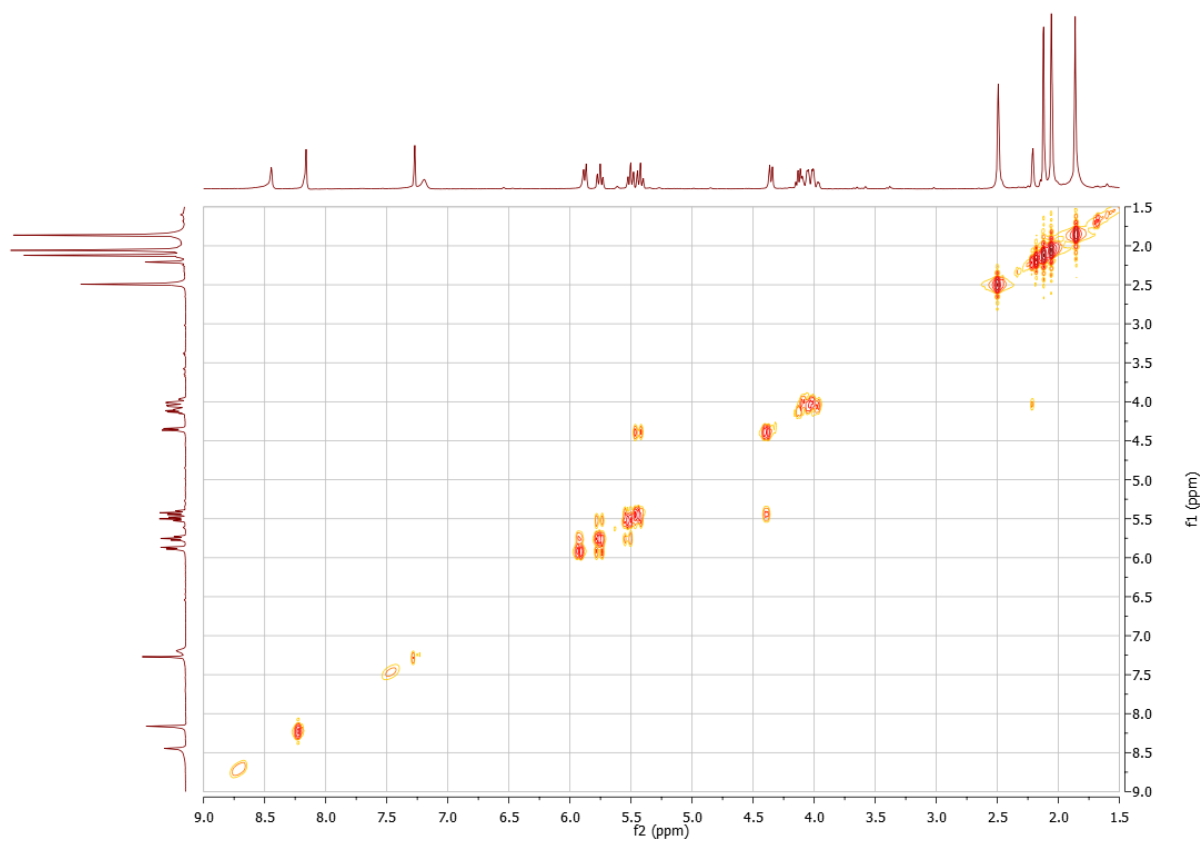


Figura 6.3 - Espectro de COSY do composto **1**.

6.1.1.4 HSQC

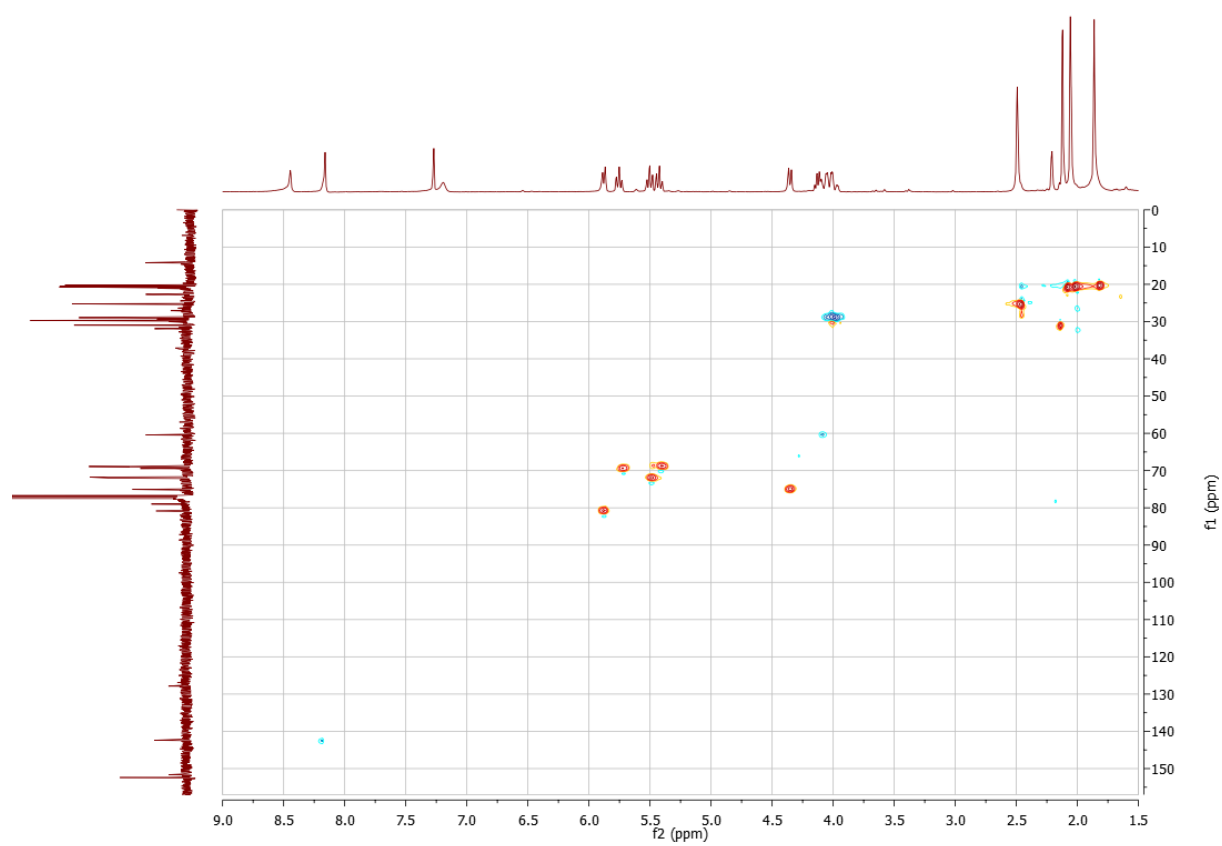


Figura 6.4 - Espectro de HSQC do composto **1**.

6.1.1.5 HMBC

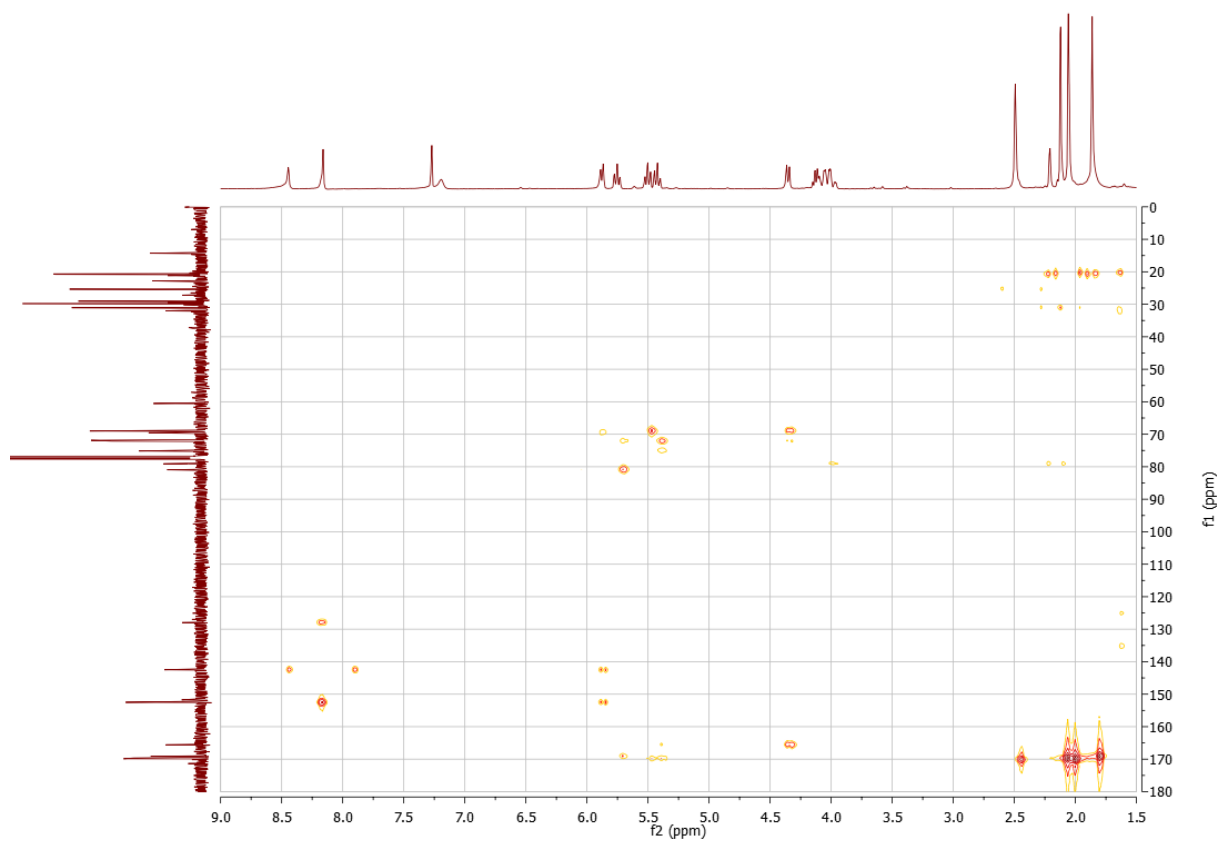


Figura 6.5 - Espectro de HMBC do composto **1**.

6.1.2 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **2**

6.1.2.1 ^1H -RMN

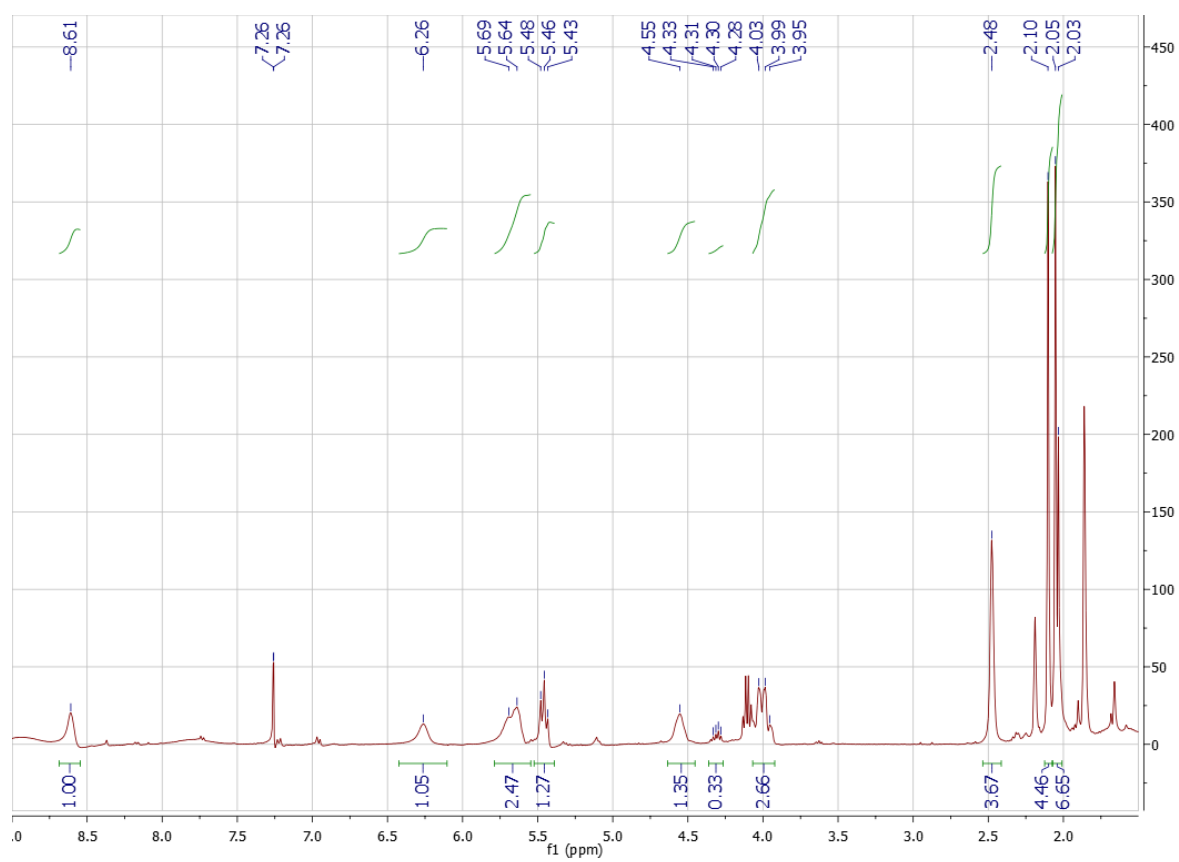
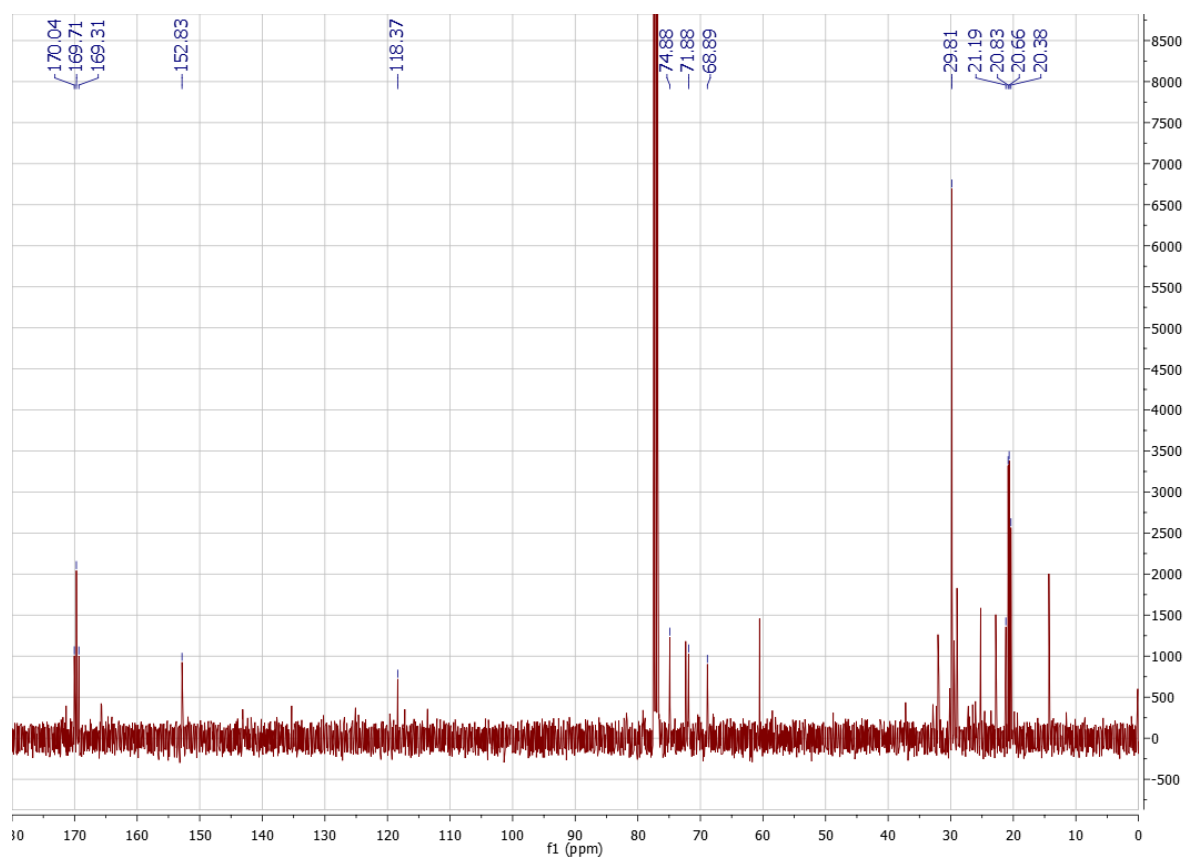


Figura 6.6 - Espetro de ^1H -RMN do composto **2**.

6.1.2.2 ^{13}C -RMNFigura 6.7 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto 2.

6.1.2.3 COSY

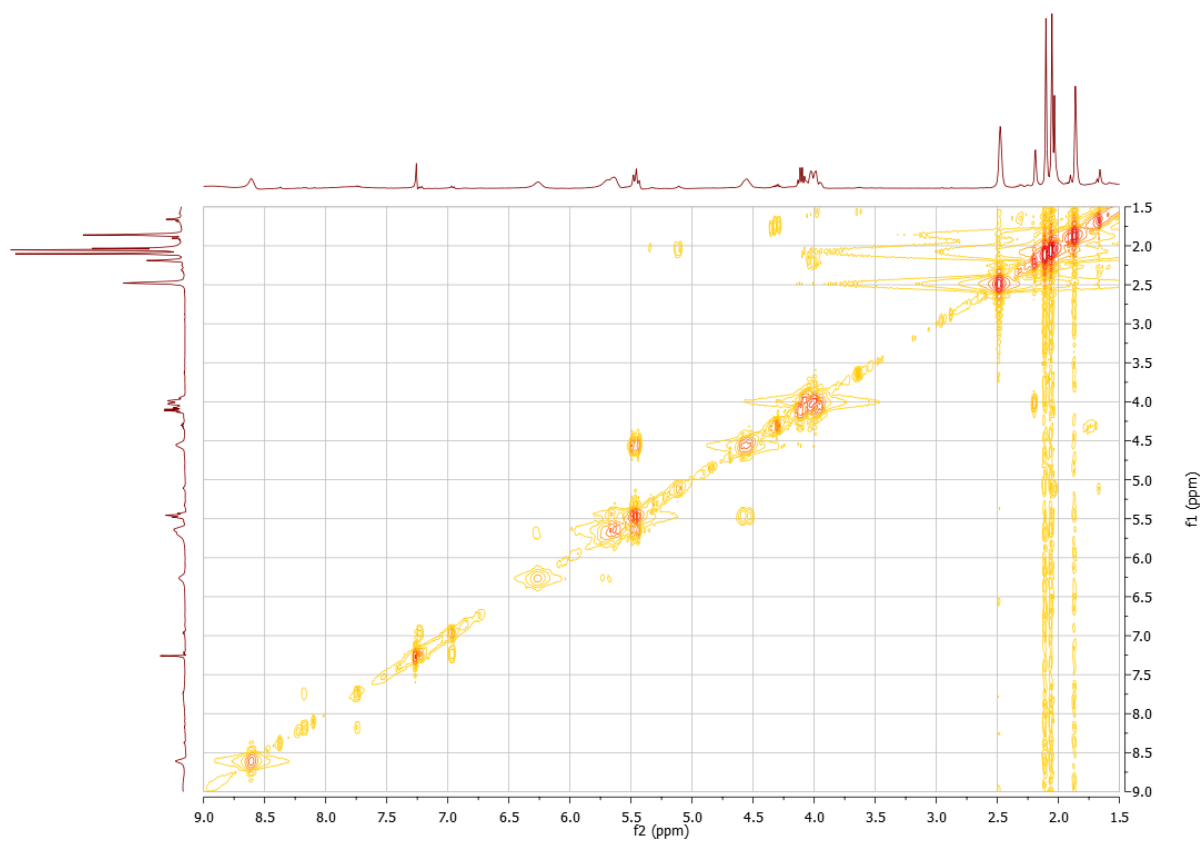


Figura 6.8 - Espectro de COSY do composto **2**.

6.1.2.4 HSQC

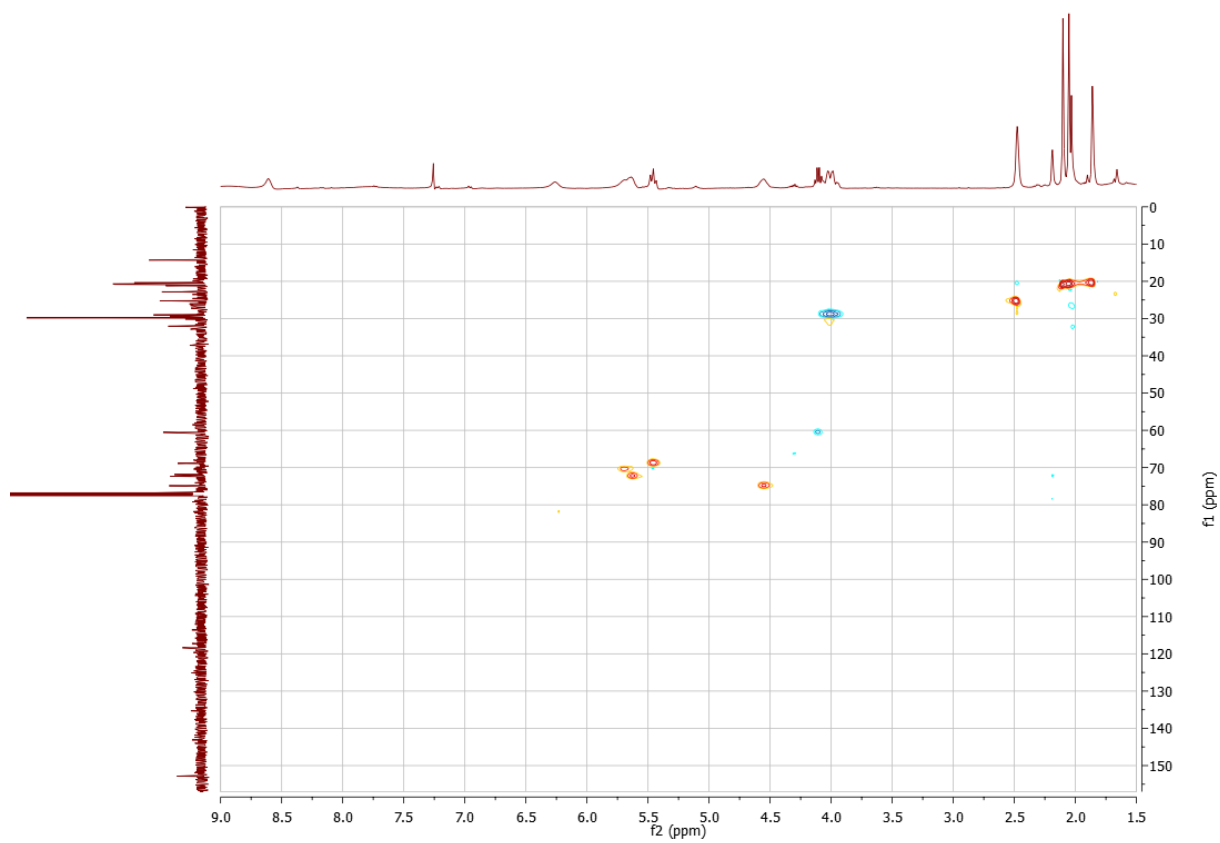


Figura 6.9 - Espectro de HSQC do composto **2**.

6.1.2.5 HMBC

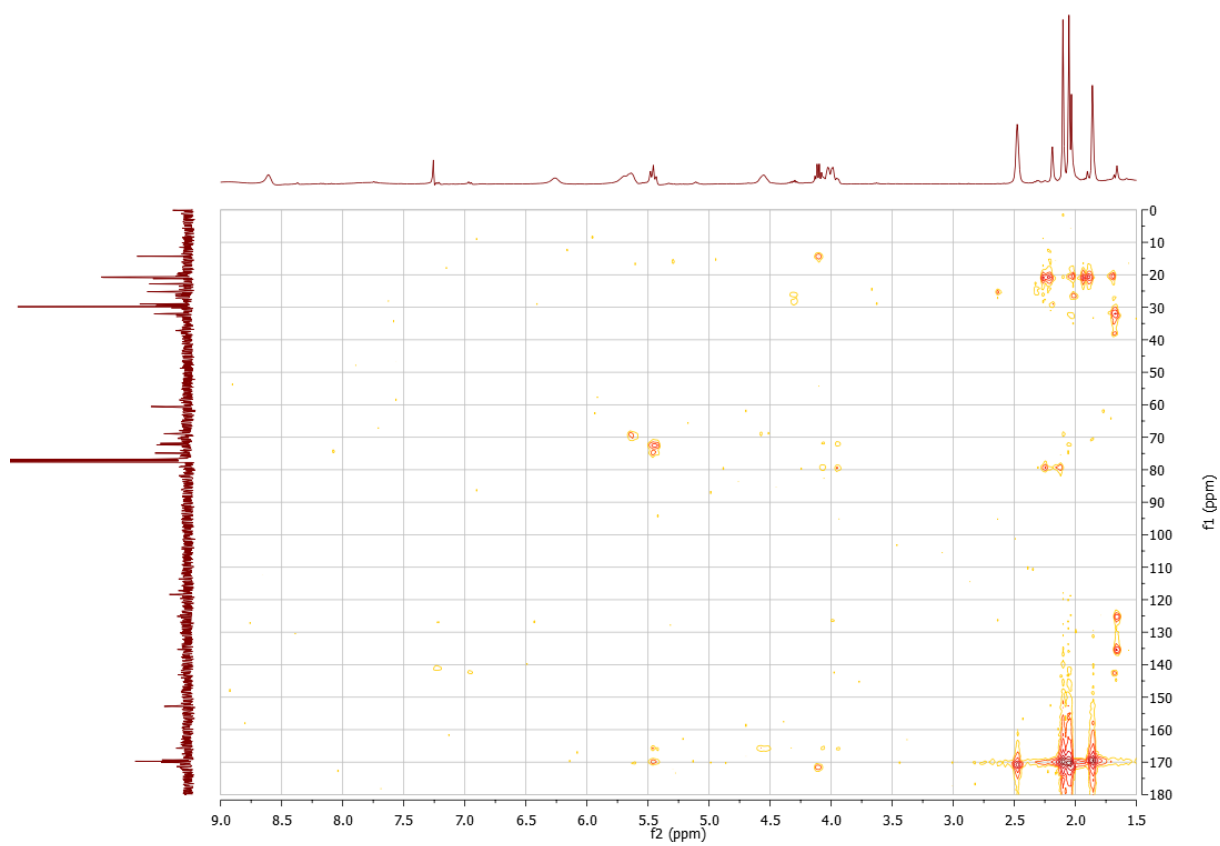
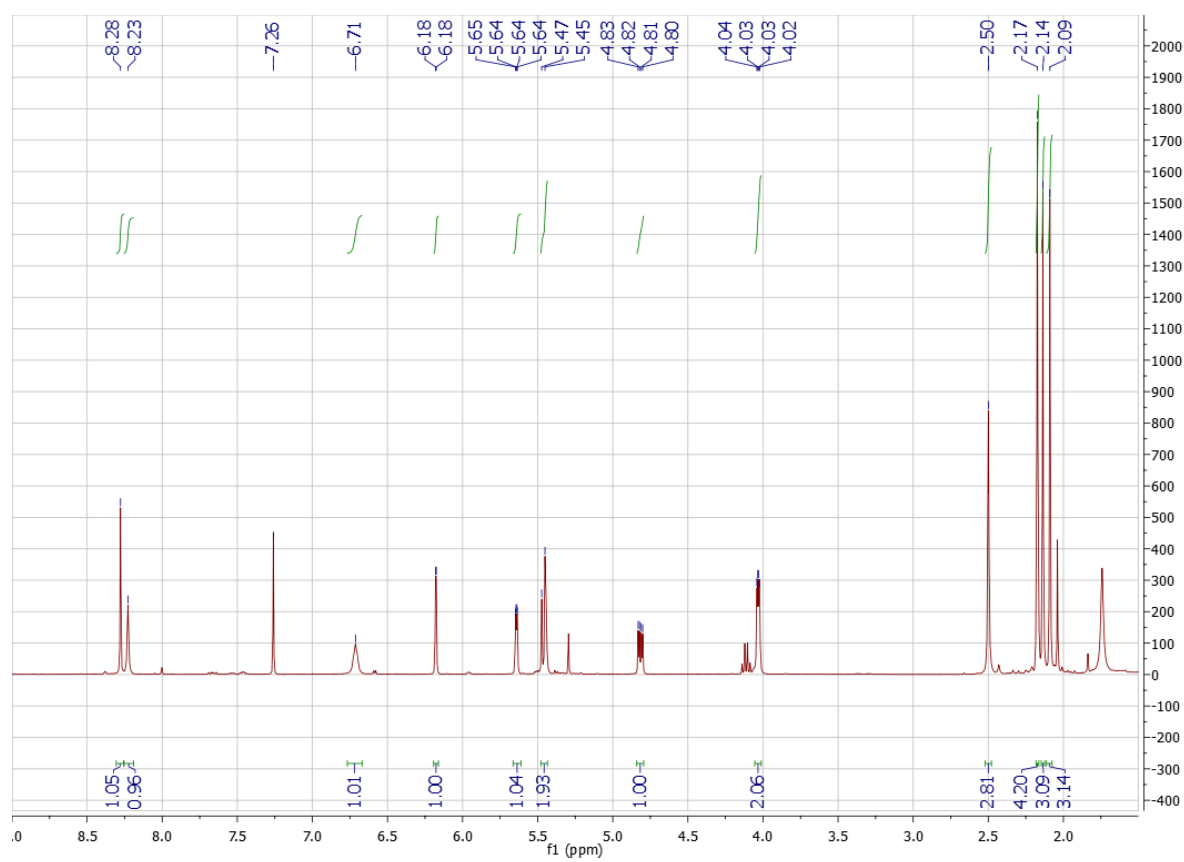
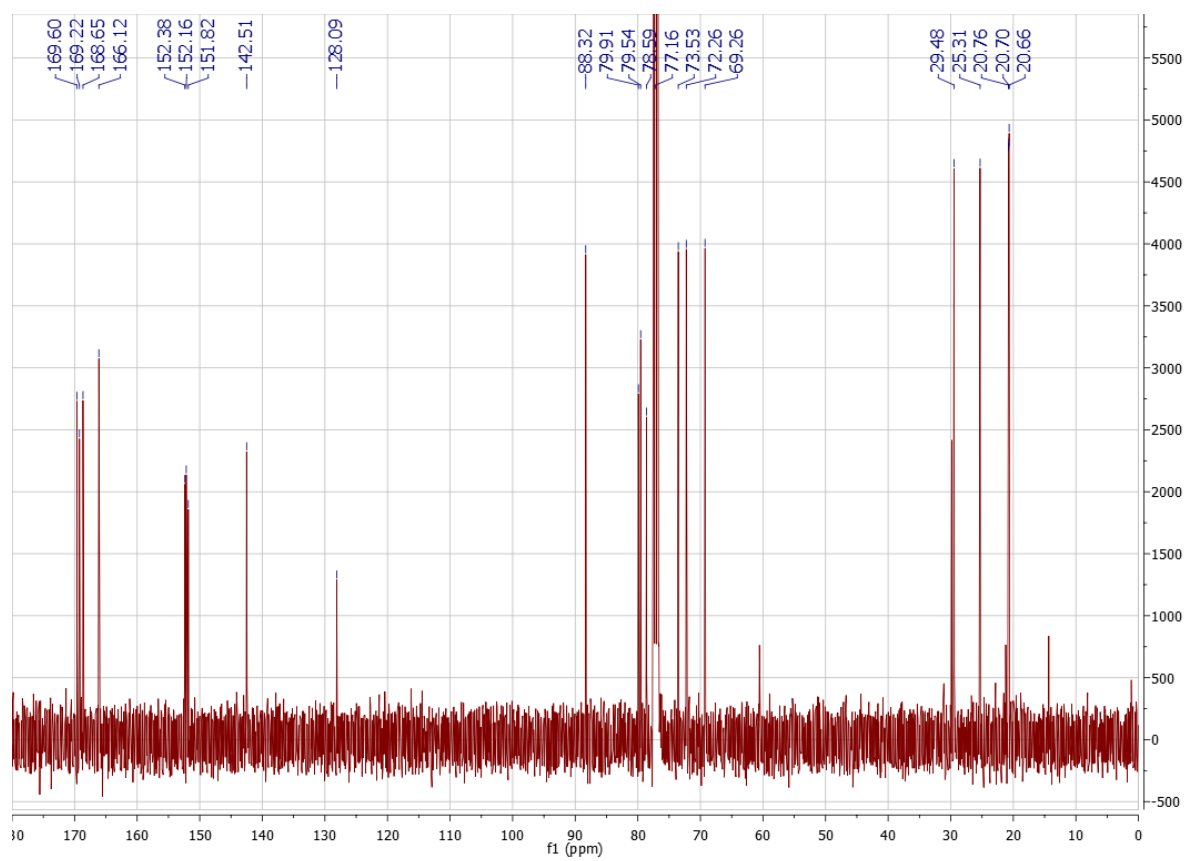


Figura 6.10 - Espectro de HMBC do composto 2.

6.1.3 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **3**6.1.3.1 ^1H -RMNFigura 6.11 - Espetro de ^1H -RMN do composto **3**.

6.1.3.2 ^{13}C -RMNFigura 6.12 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto 3.

6.1.3.3 COSY

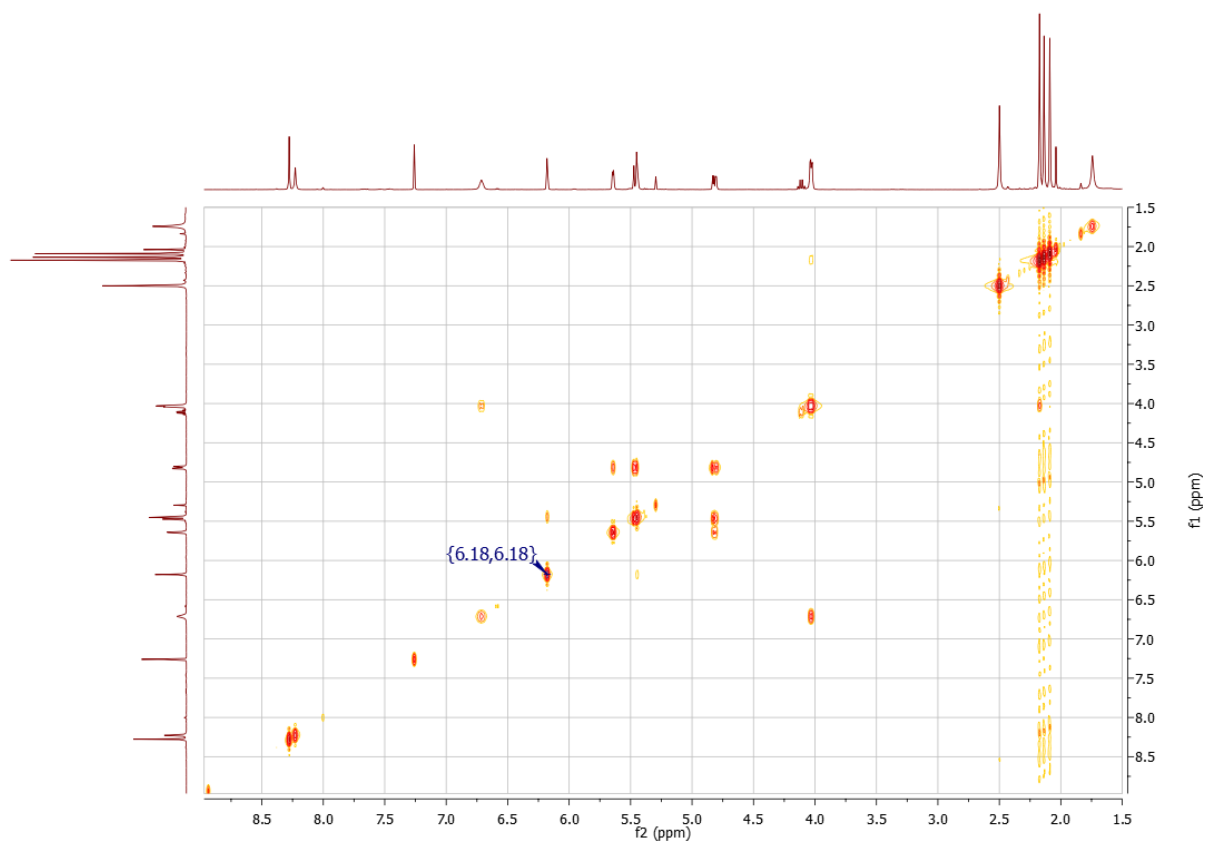


Figura 6.13 - Espectro de COSY do composto **3**.

6.1.3.4 HSQC

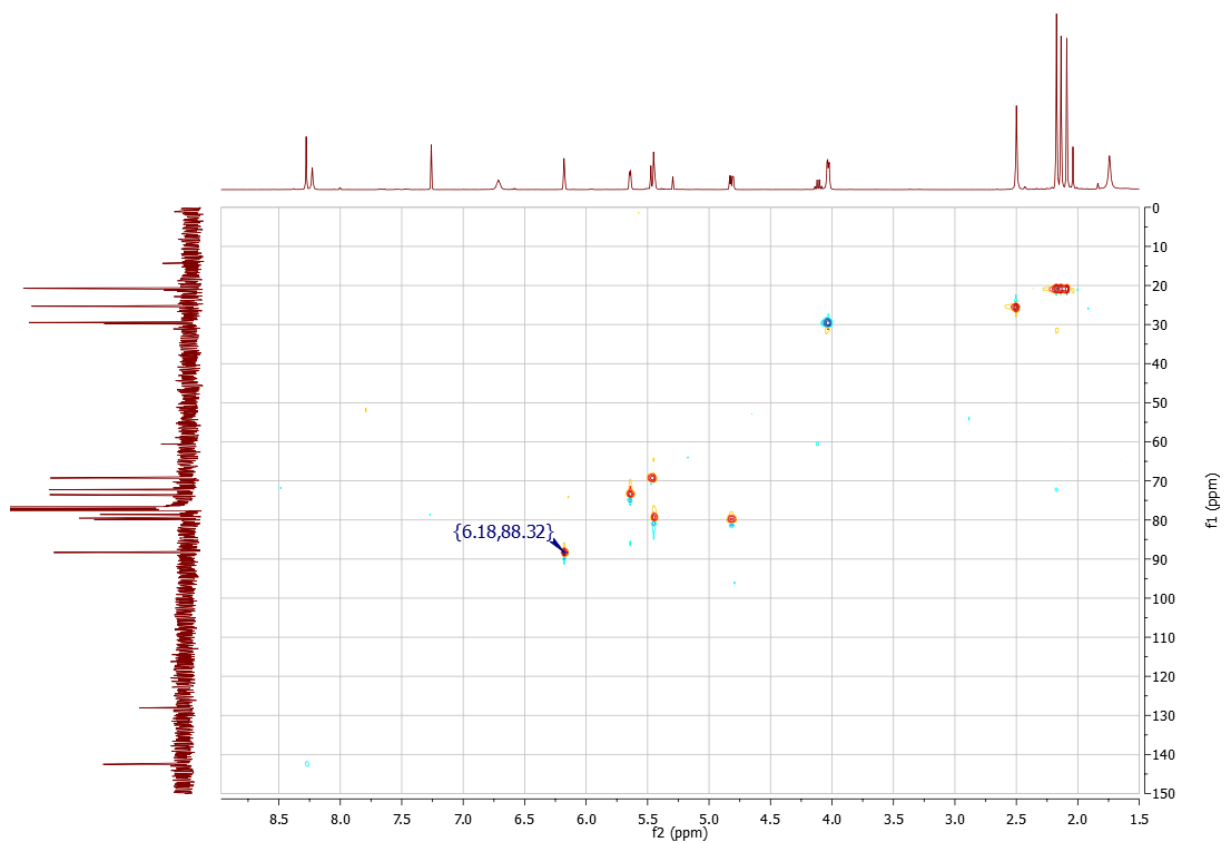
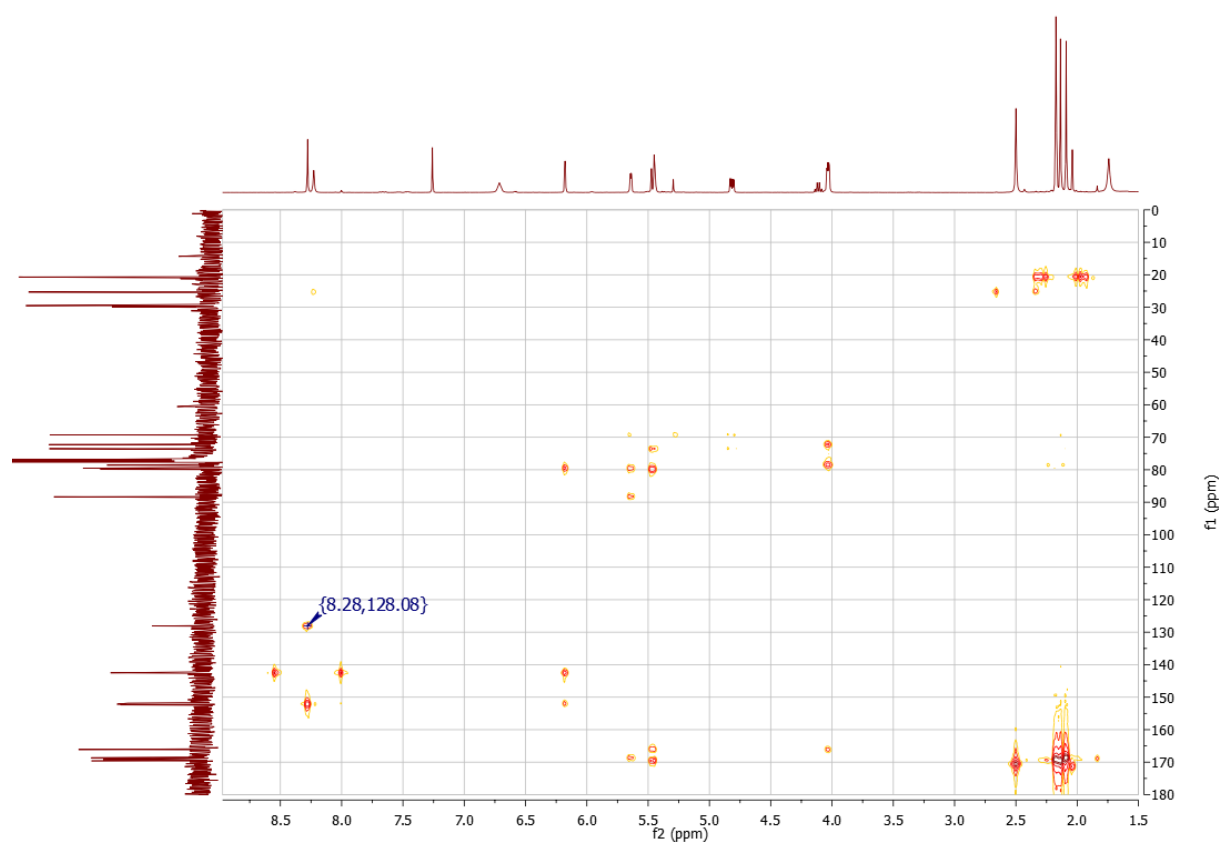


Figura 6.14 - Espectro de HSQC do composto **3**.

6.1.3.5 HMBC

Figura 6.15 - Espetro de HMBC do composto **3**.

6.1.4 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **4**

6.1.4.1 ^1H -RMN

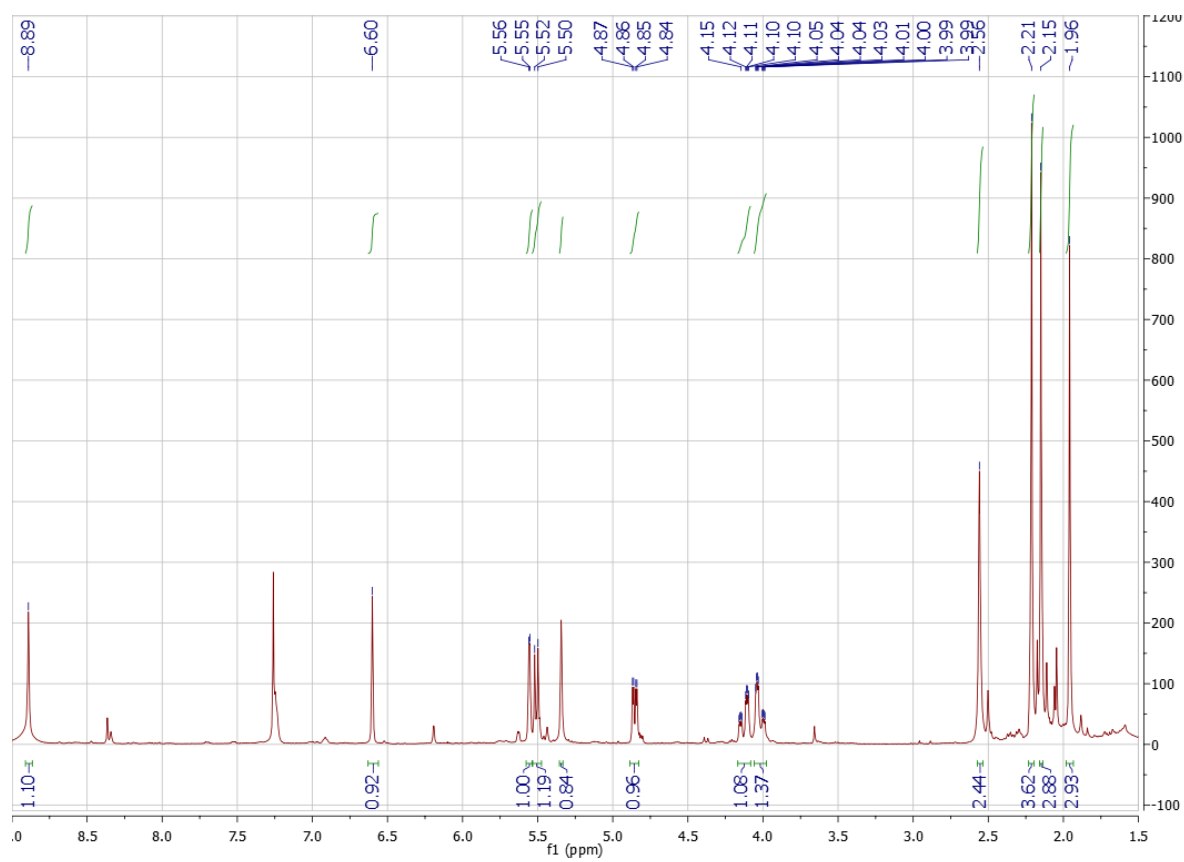
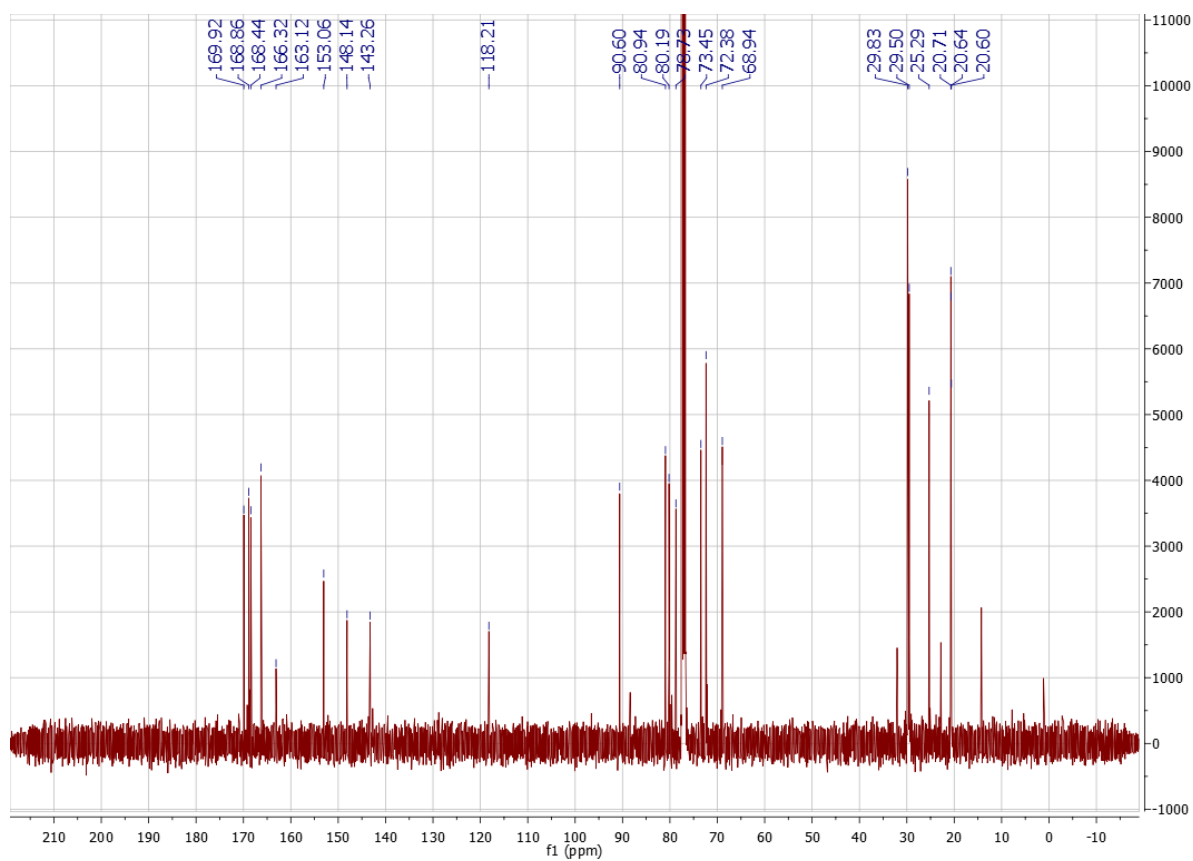


Figura 6.16 - Espetro de ^1H -RMN do composto **4**.

6.1.4.2 ^{13}C -RMNFigura 6.17 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto **4**.

6.1.4.3 COSY

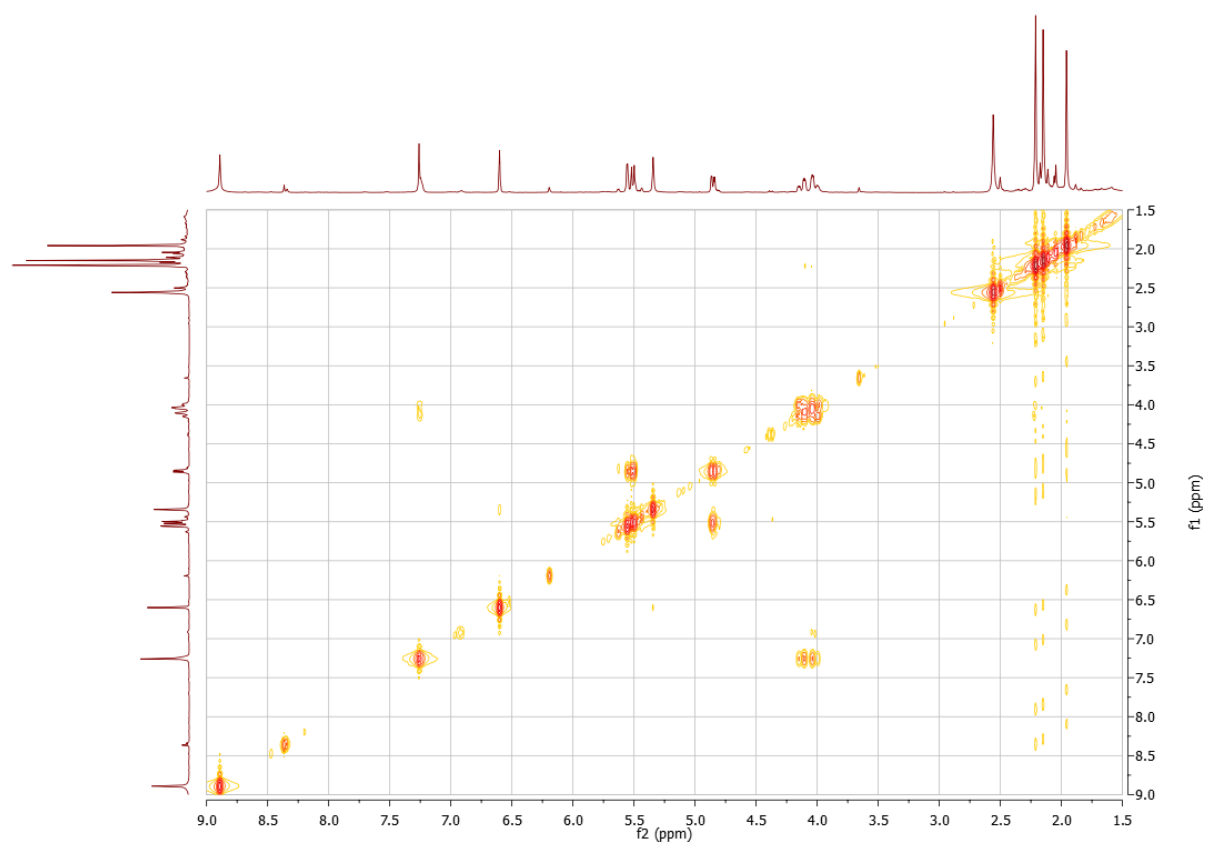


Figura 6.18 - Espectro de COSY do composto **4**.

6.1.4.4 HSQC

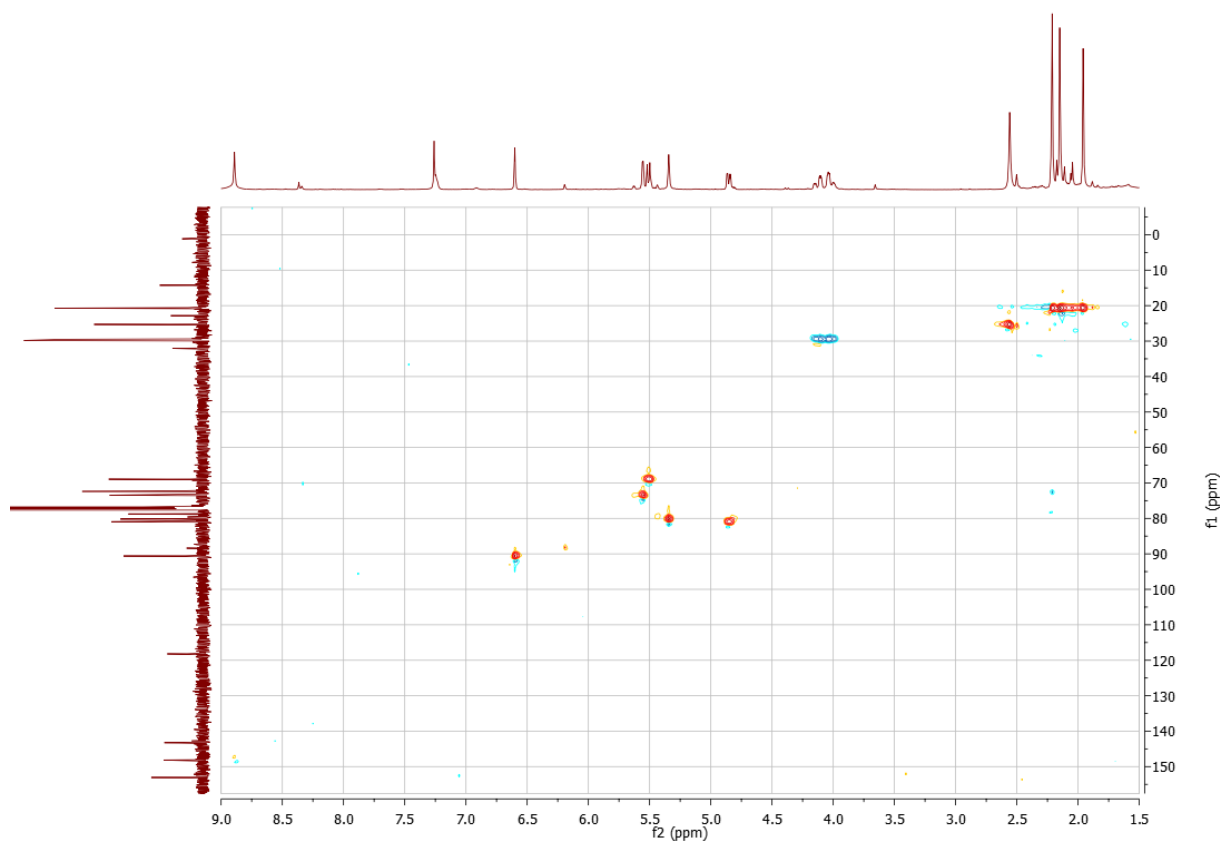


Figura 6.19 - Espectro de HSQC do composto **4**.

6.1.4.5 HMBC

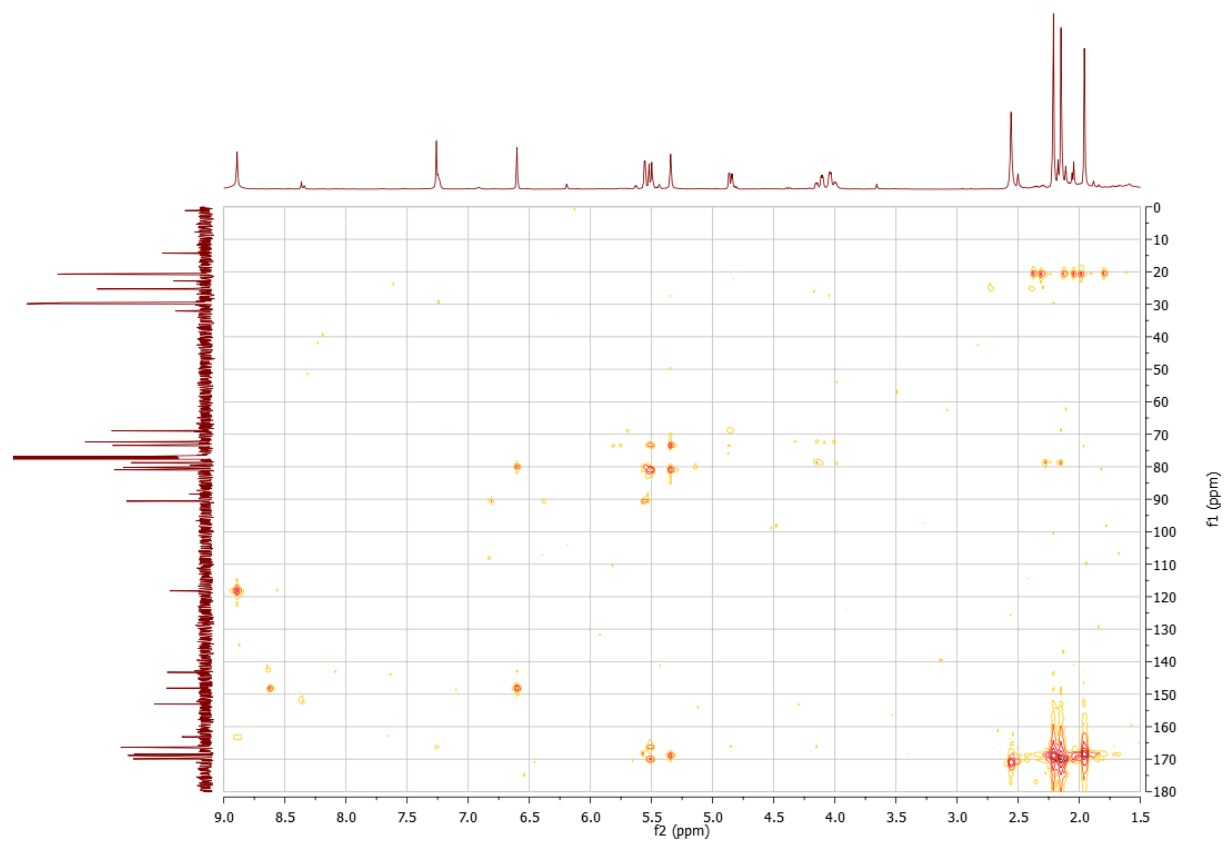


Figura 6.20 - Espetro de HMBC do composto **4**.

6.1.5 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **5**

6.1.5.1 ¹H-RMN

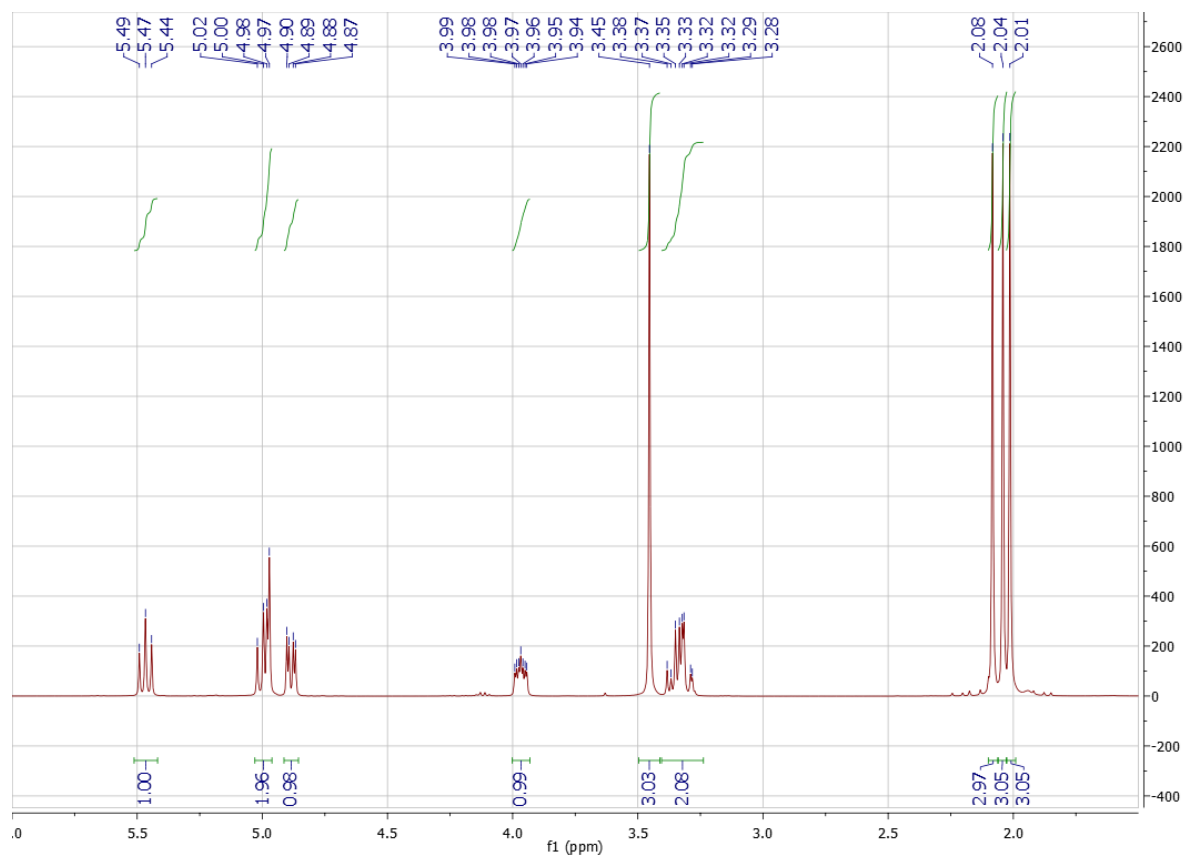


Figura 6.21 - Espetro de ^1H -RMN do composto **5**.

6.1.5.2 ^{13}C -RMN

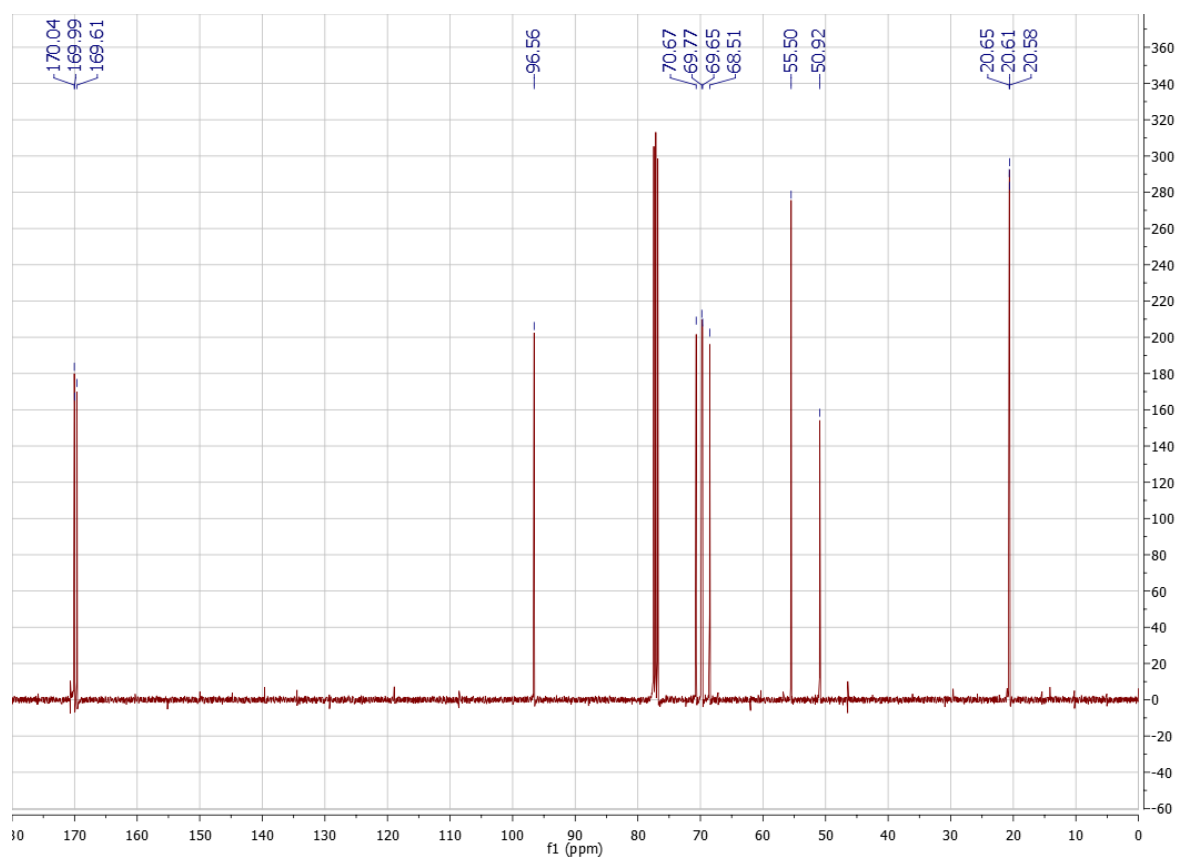


Figura 6.22 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto **5**.

6.1.5.3 COSY

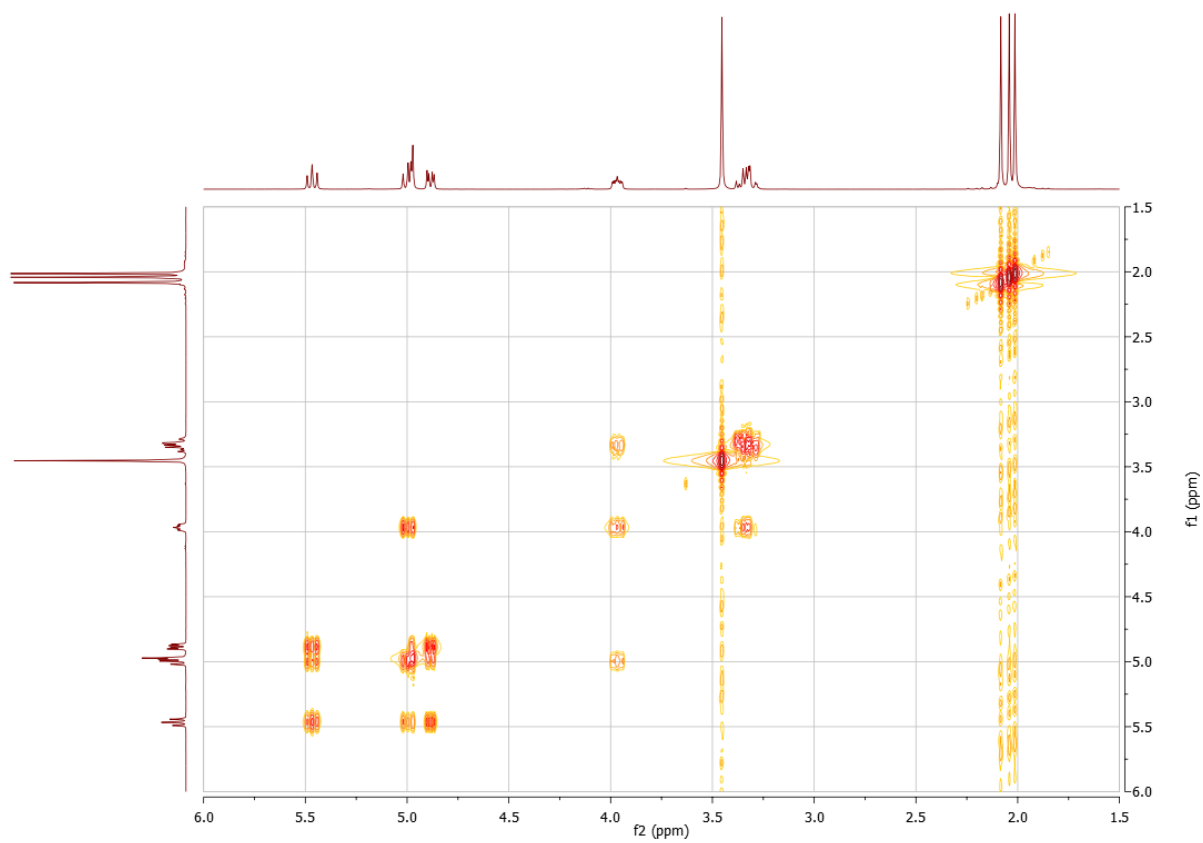


Figura 6.23 - Espetro de COSY do composto **5**.

6.1.5.4 HSQC

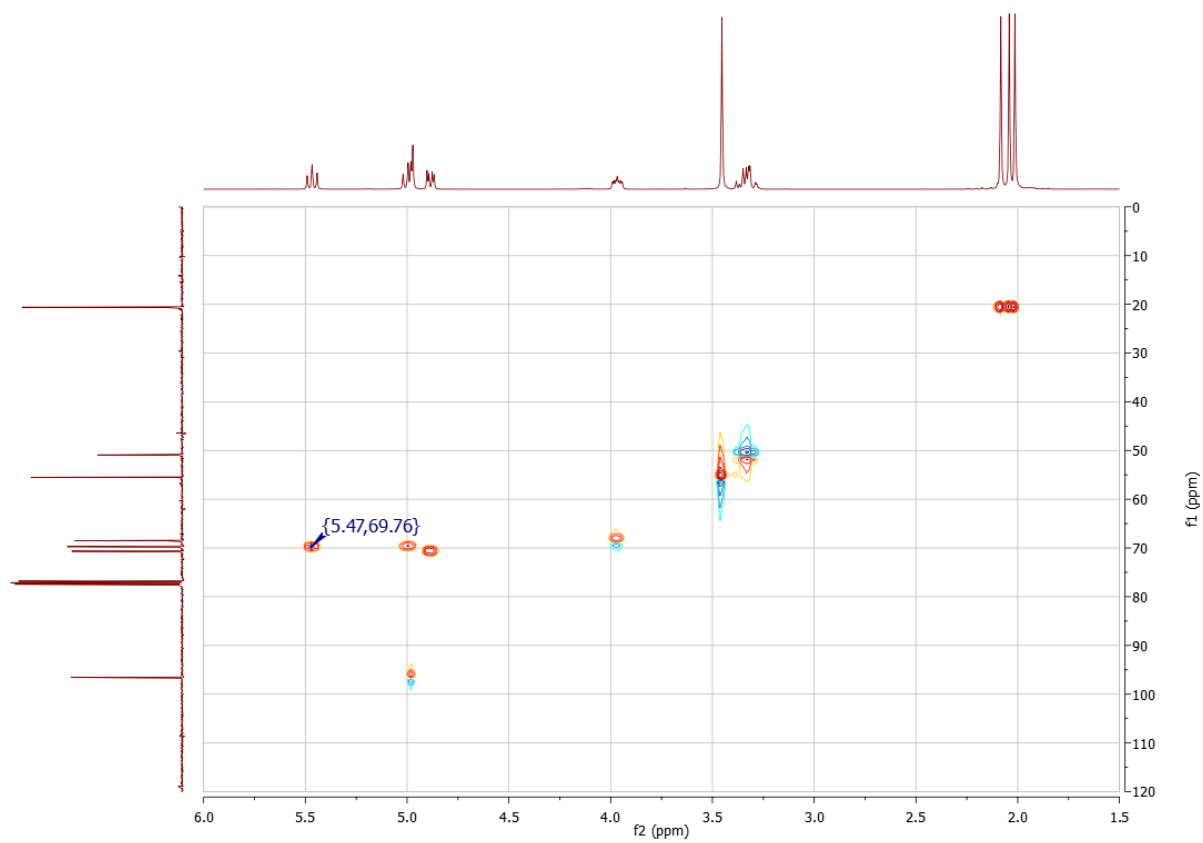


Figura 6.24 - Espetro de HSQC do composto **5**.

6.1.5.5 HMBC

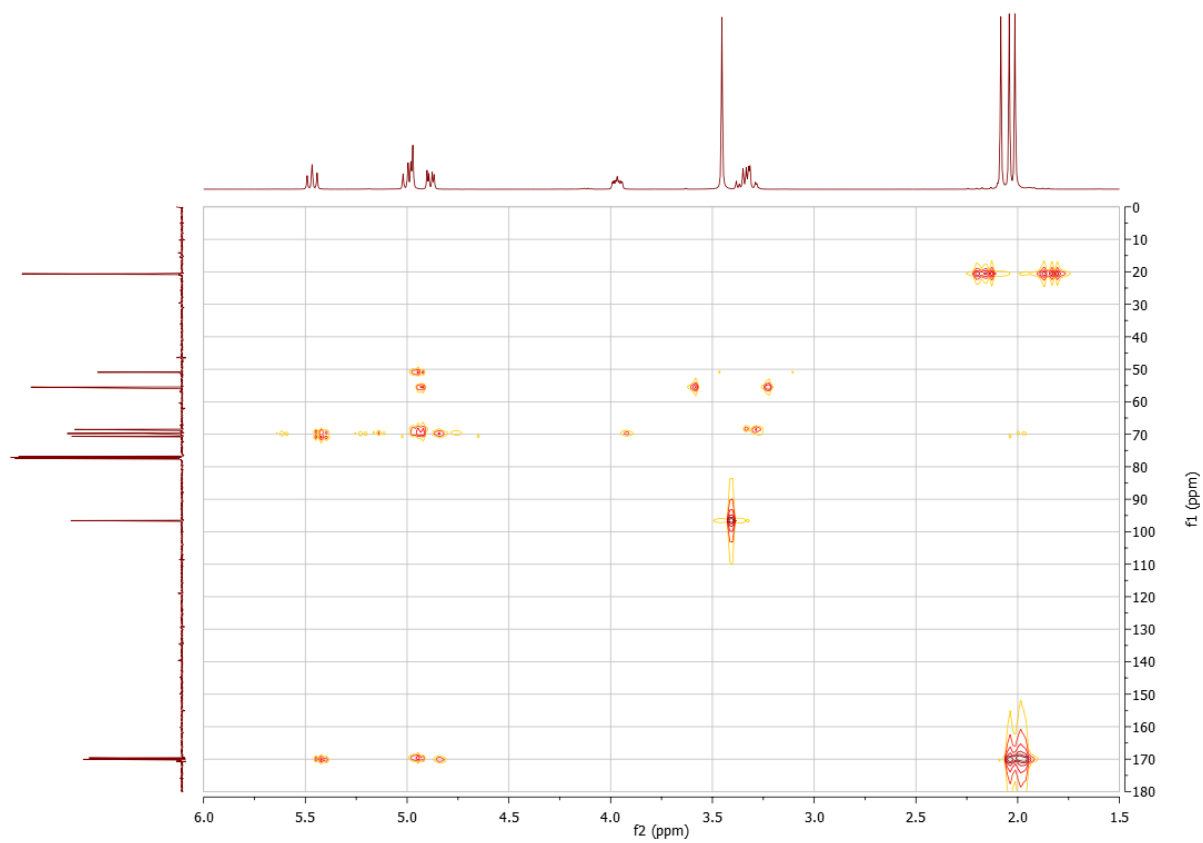


Figura 6.25 - Espetro de HMBC do composto **5**.

6.1.6 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **6**

6.1.6.1 - ^1H -RMN

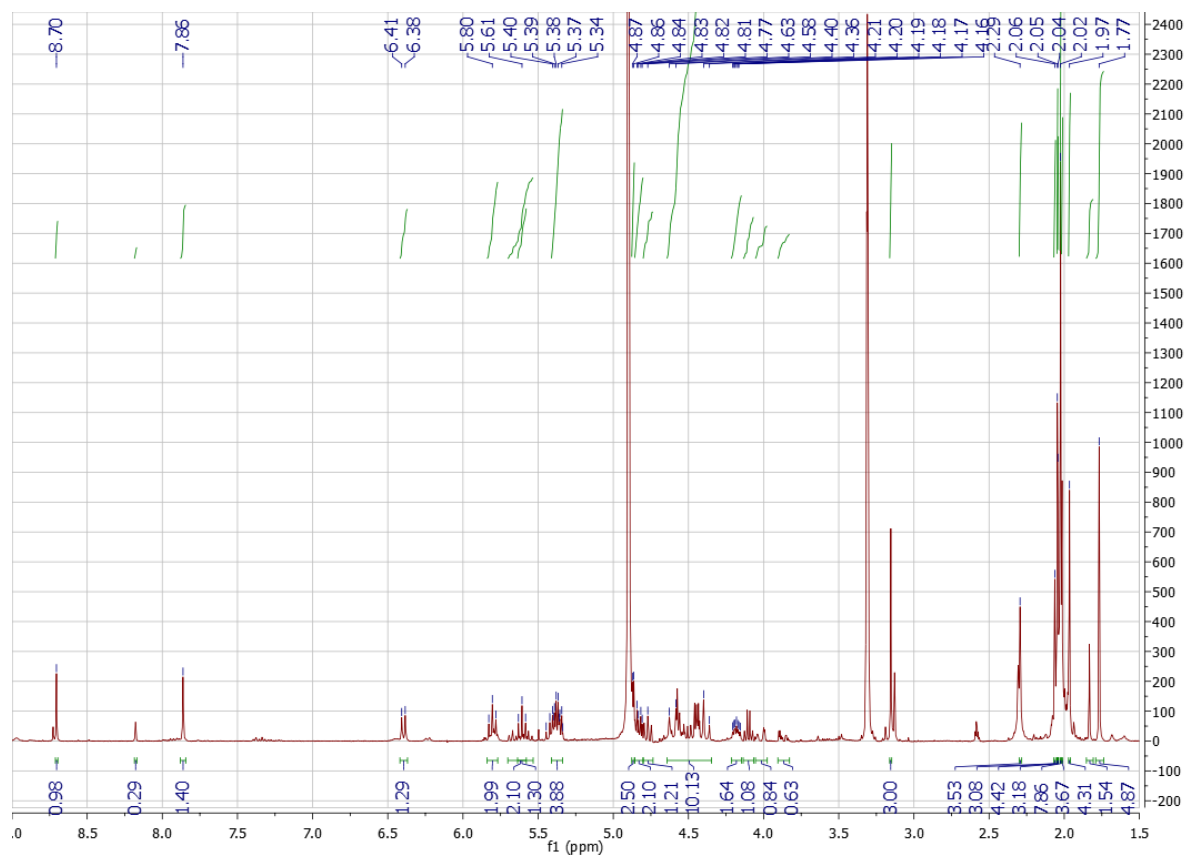


Figura 6.26 - Espetro de ^1H -RMN do composto **6**.

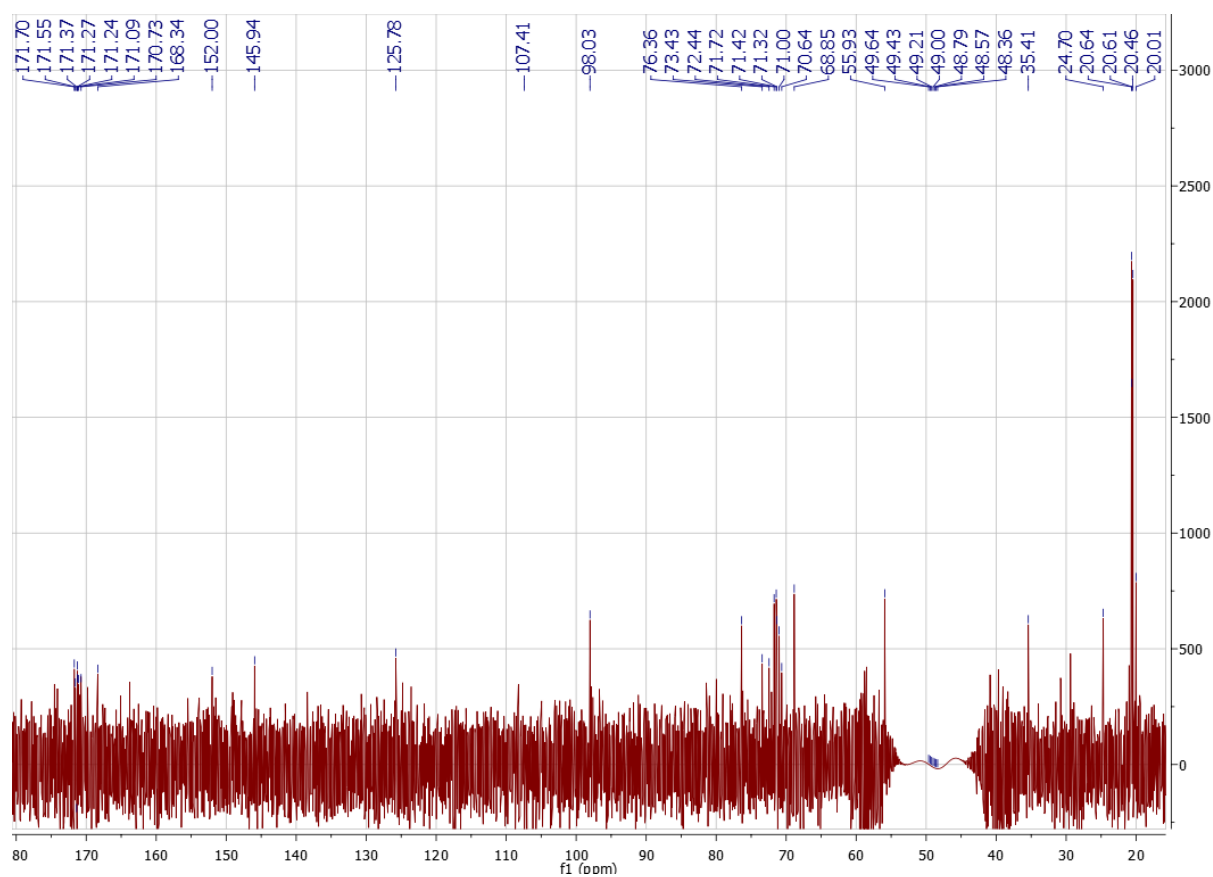
6.1.6.2 - ^{13}C -RMN

Figura 6.27 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **6**, com supressão do sinal de solvente.

6.1.6.3 - COSY

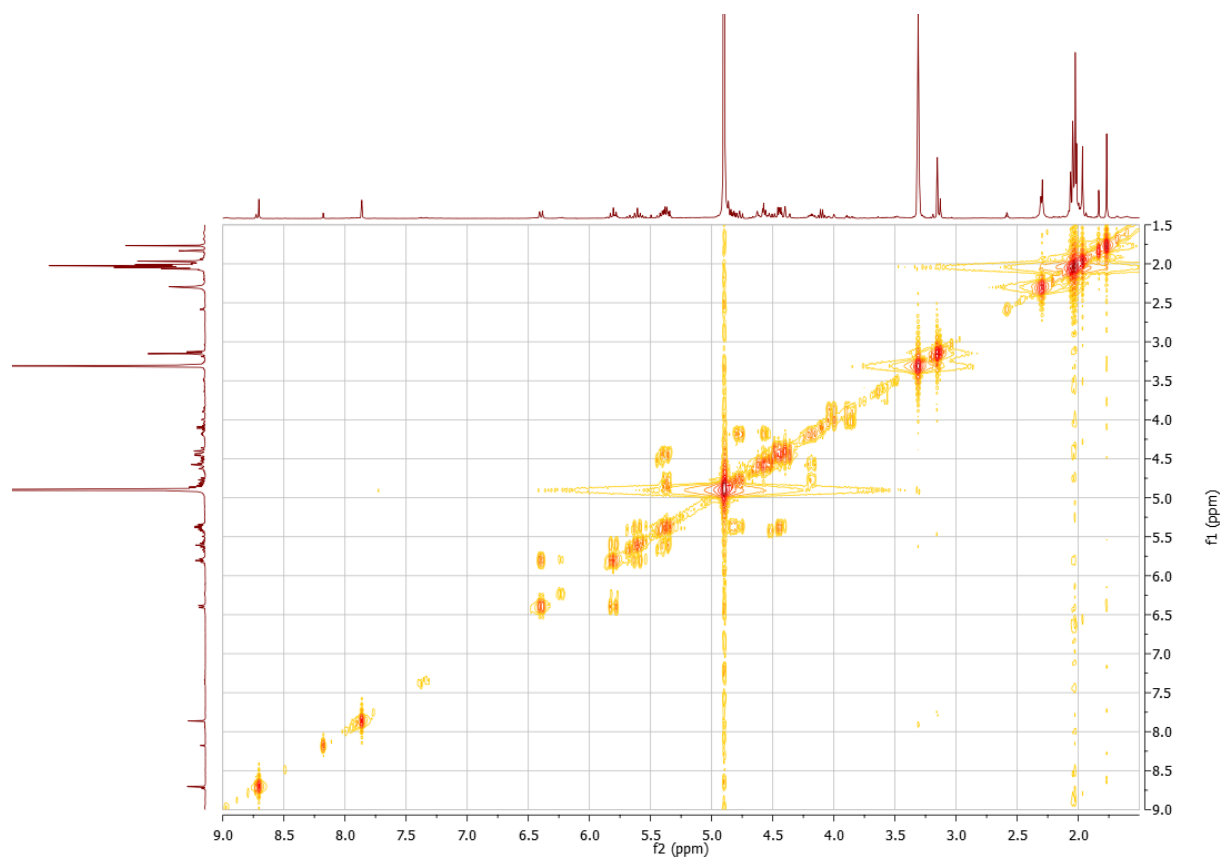


Figura 6.28 - Espectro de COSY do composto **6**.

6.1.6.4 - HSQC

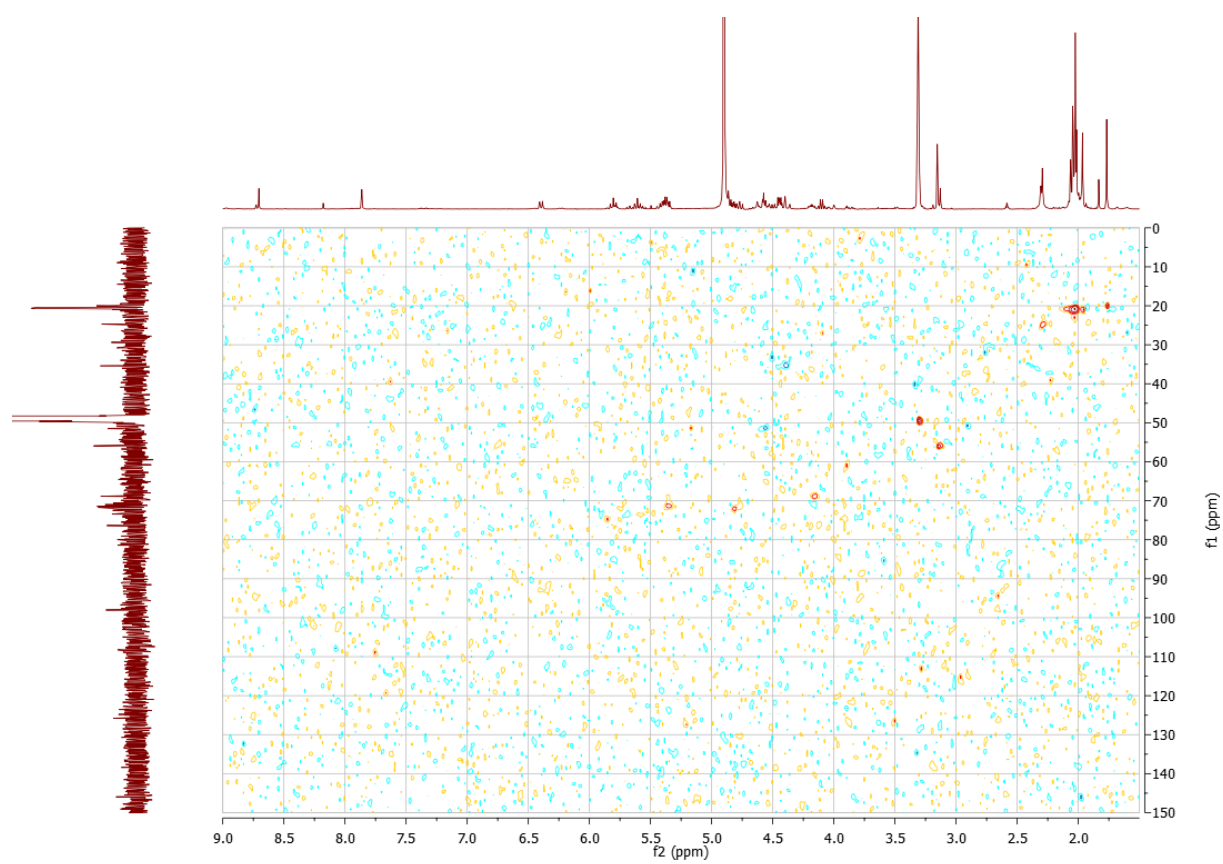


Figura 6.29 - Espectro de HSQC do composto **6**.

6.1.6.5 - HMBC

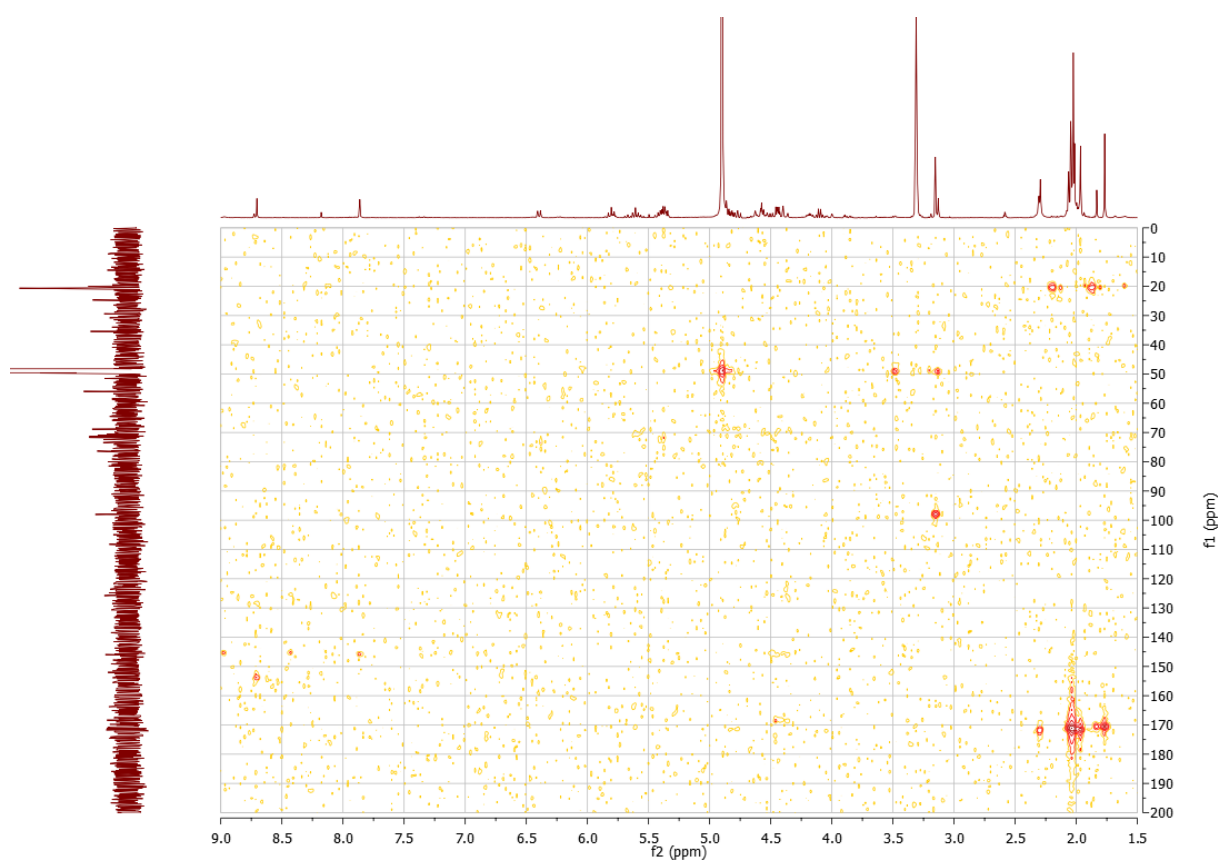


Figura 6.30 - Espectro de HMBC do composto **6**.

6.1.7 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **7**

6.1.7.1 - ^1H -RMN

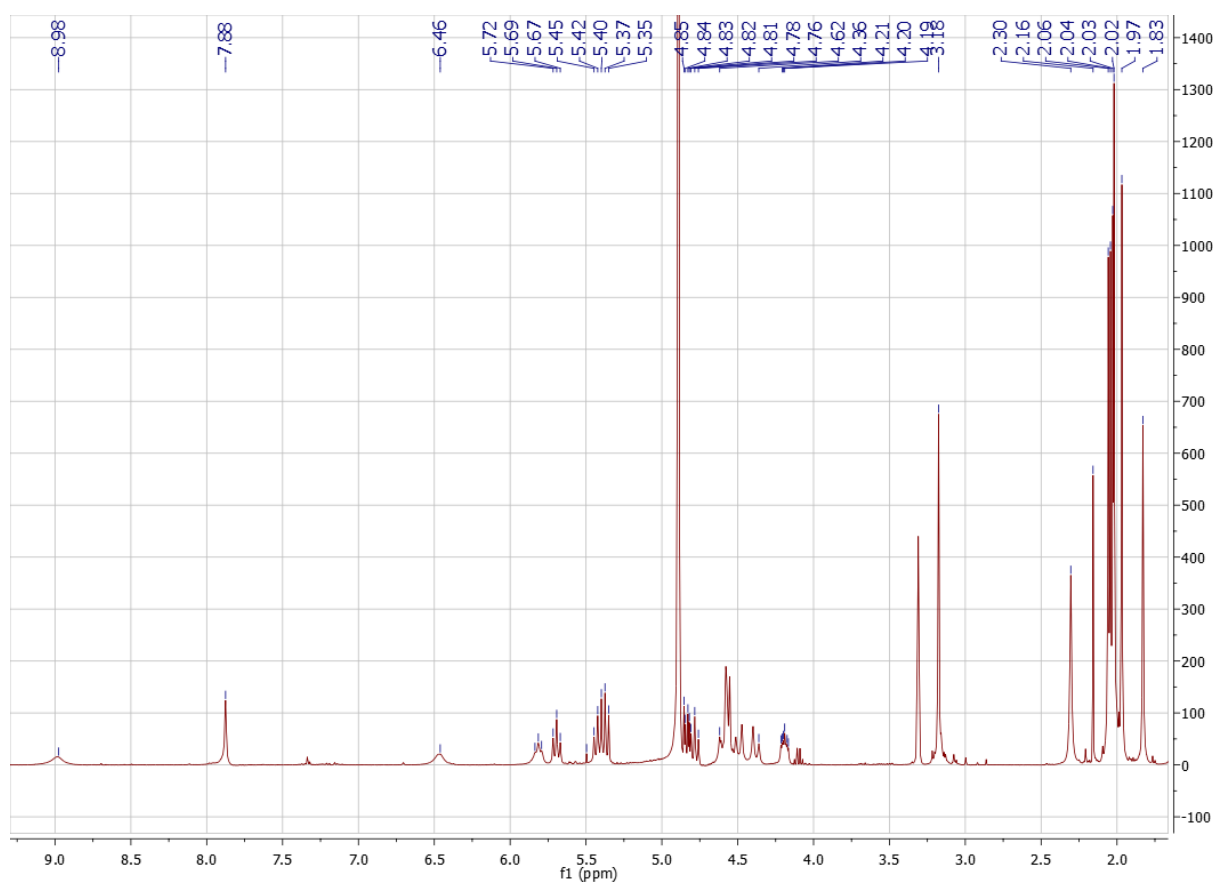


Figura 6.31 - Espetro de ^1H -RMN do composto **7**.

6.1.7.2 - ^{13}C -RMN

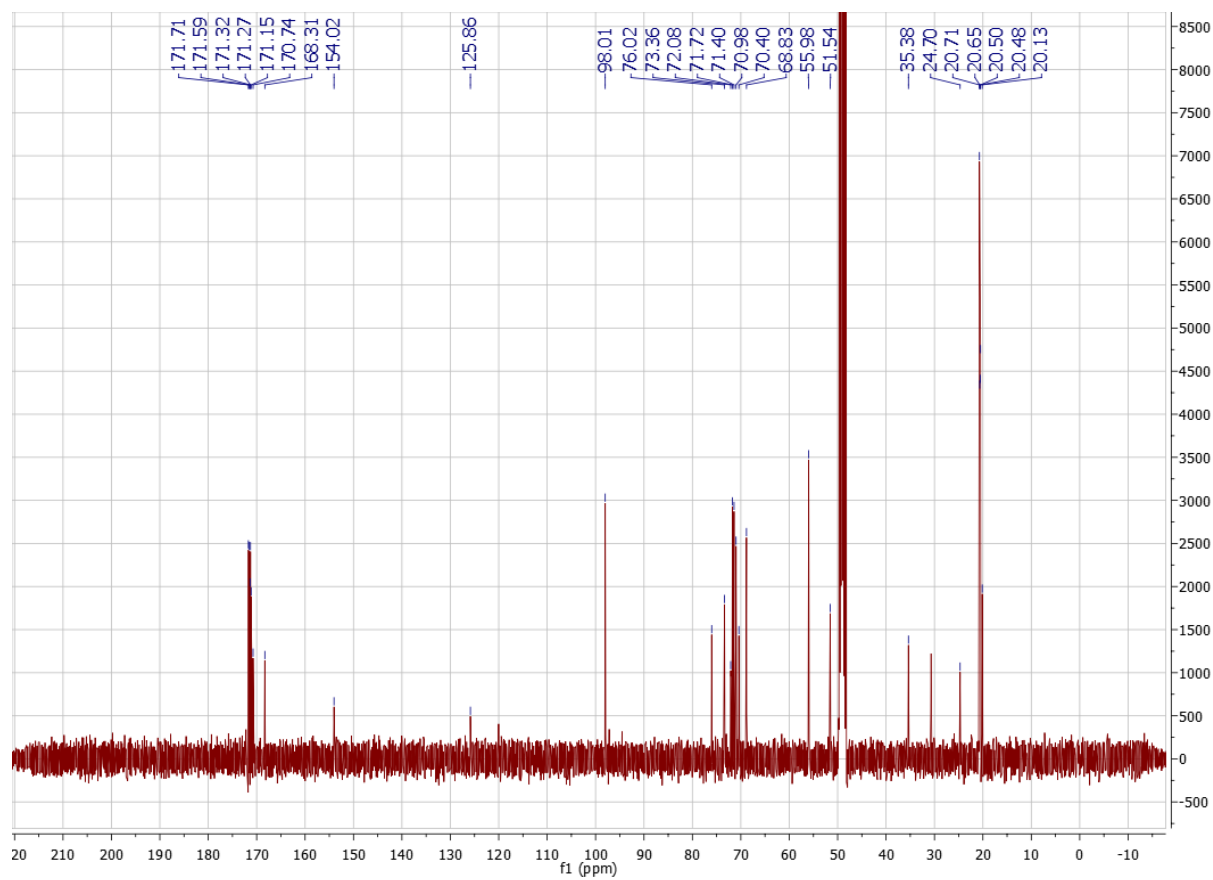


Figura 6.32 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **7**.

6.1.7.3 - COSY

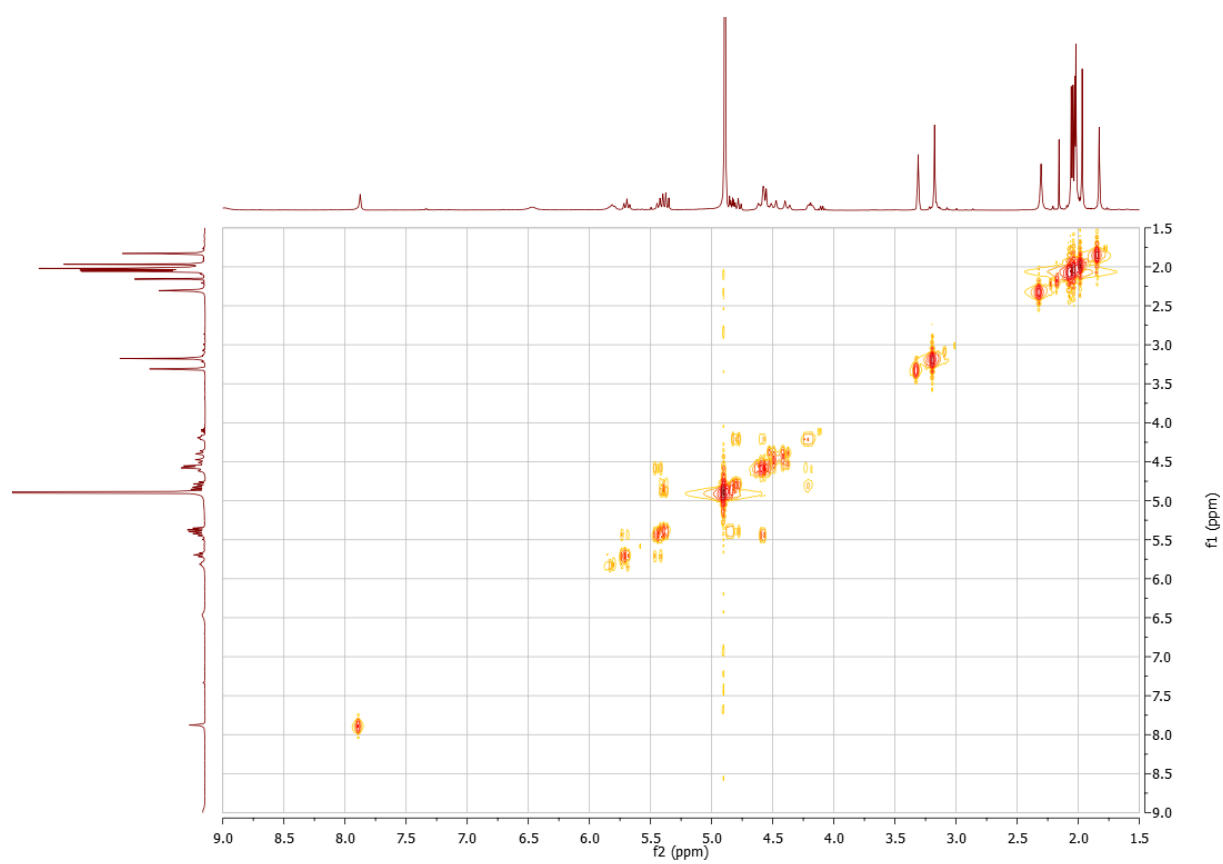


Figura 6.33 - Espetro de COSY do composto 7.

6.1.7.4 - HSQC

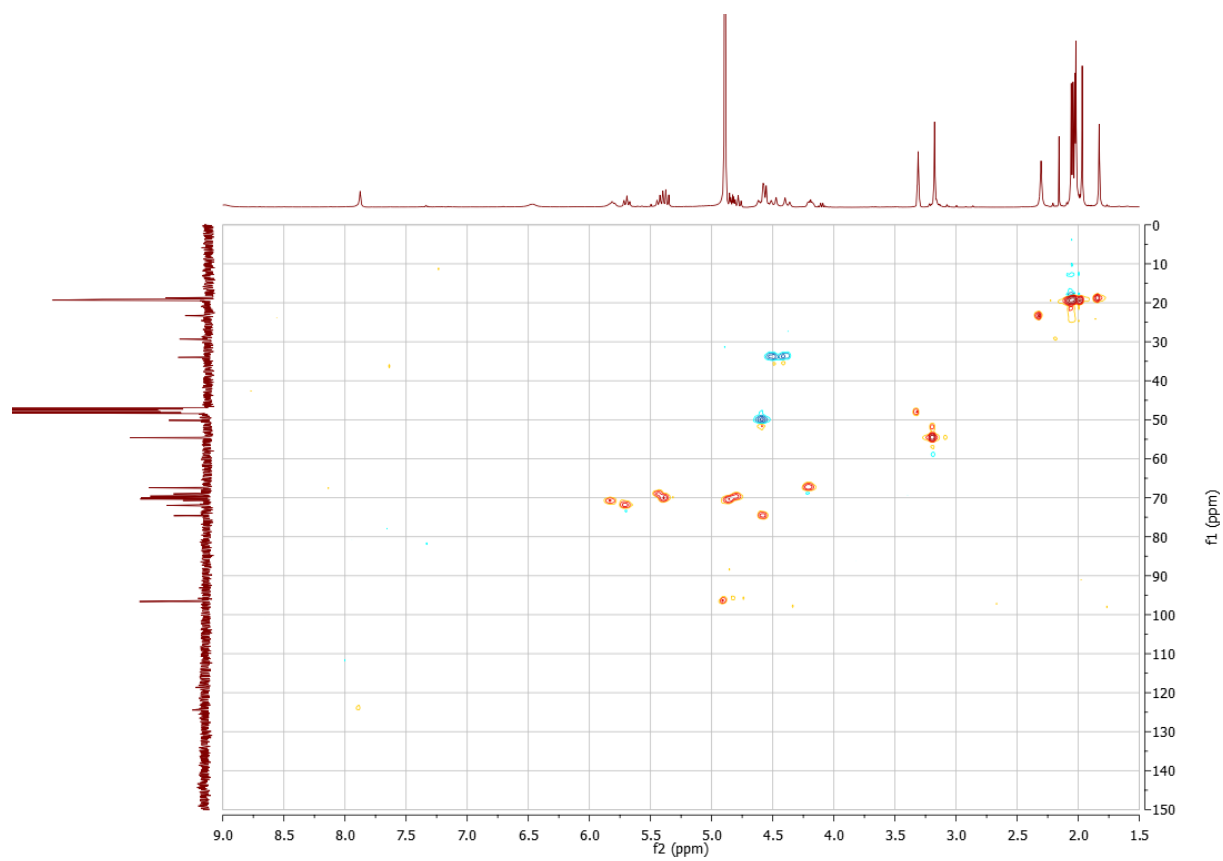


Figura 6.34 - Espetro de HSQC do composto **7**.

6.1.7.5 - HMBC

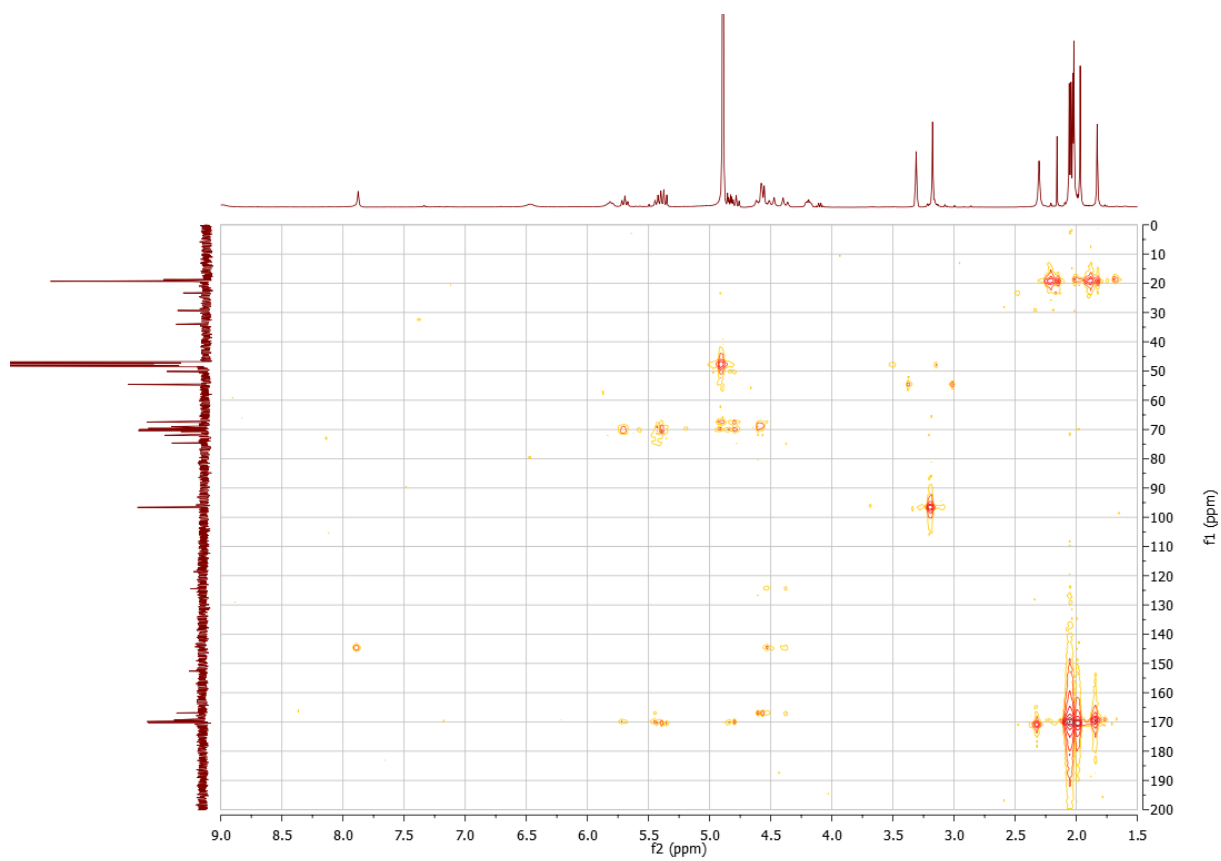
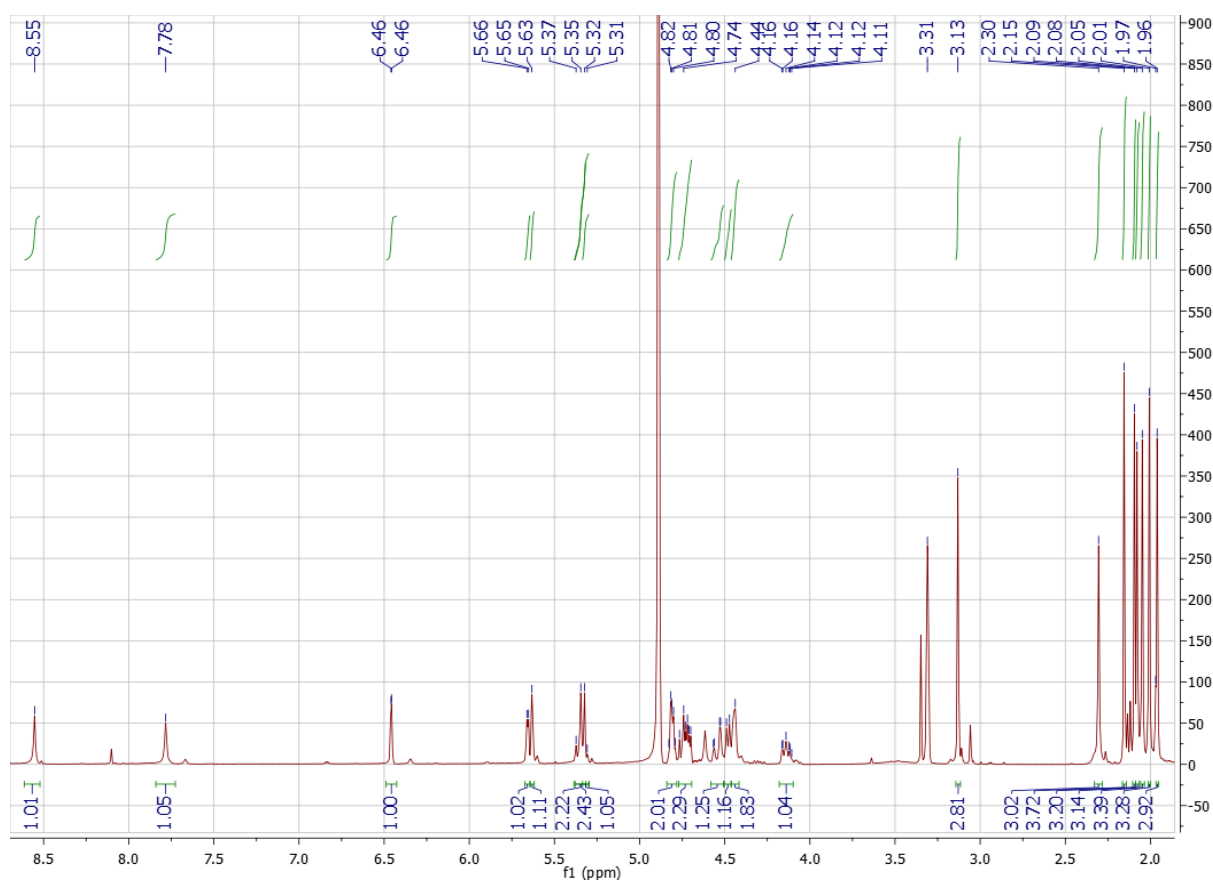
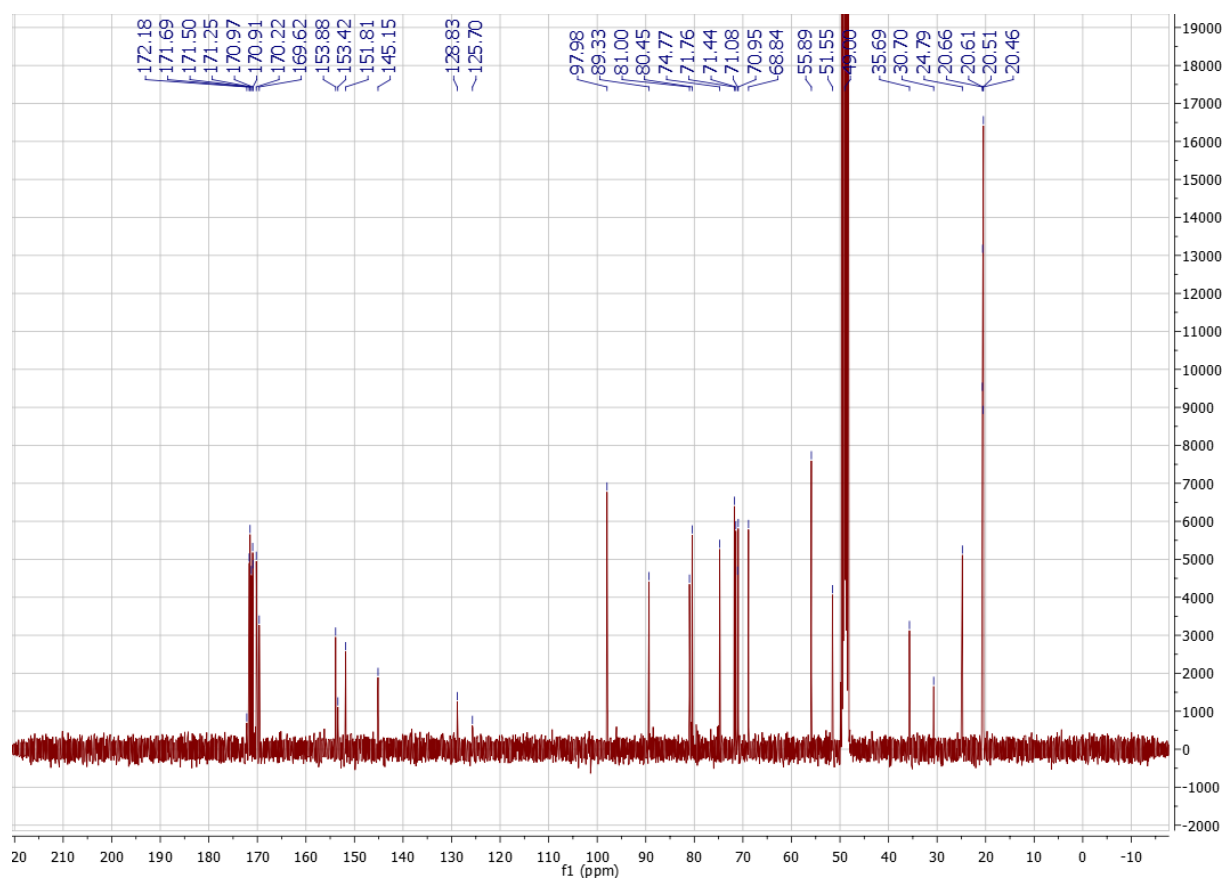


Figura 6.35 - Espectro de HMBC do composto **7**.

6.1.8 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **8**6.1.8.1 - ^1H -RMNFigura 6.36 - Espetro de ^1H -RMN do composto **8**.

6.1.8.2 - ^{13}C -RMNFigura 6.37 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **8**.

6.1.8.3 - COSY

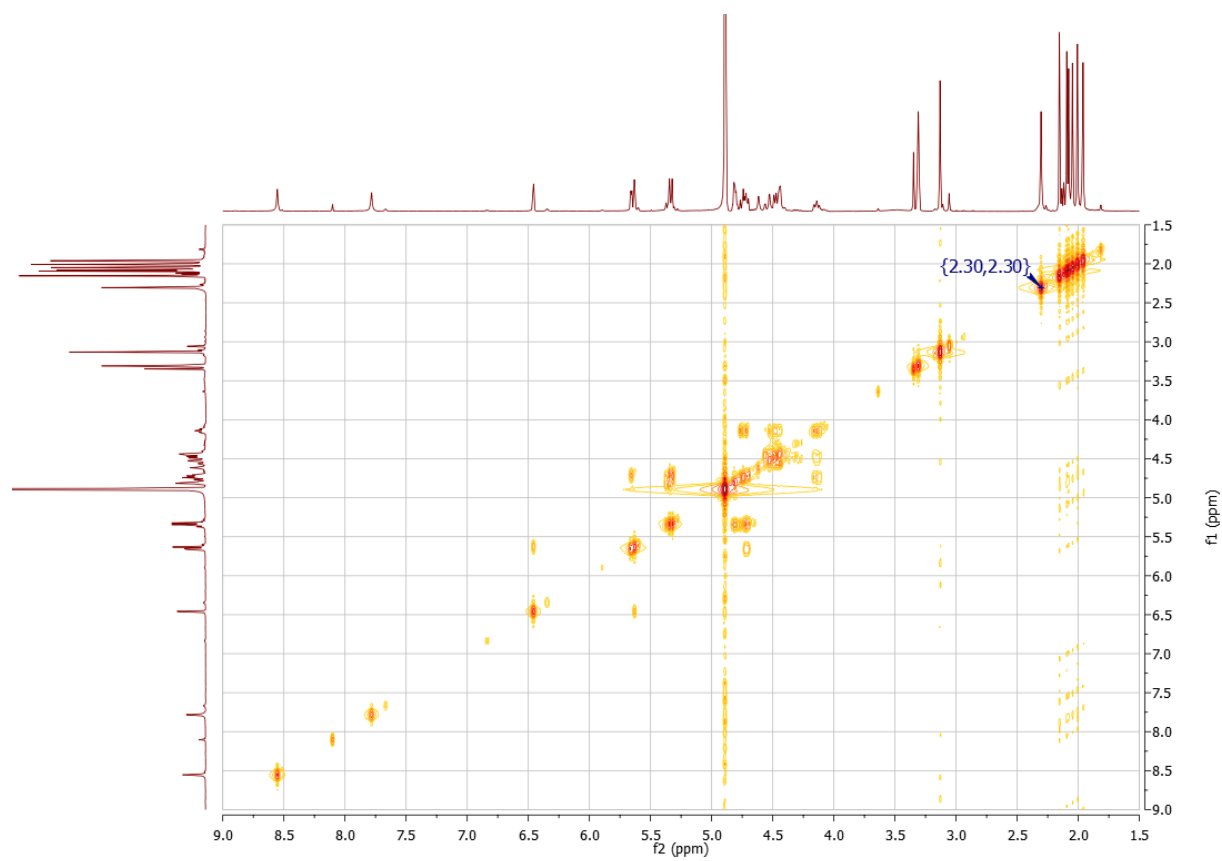


Figura 6.38 - Espetro de COSY do composto **8**.

6.1.8.4 - HSQC

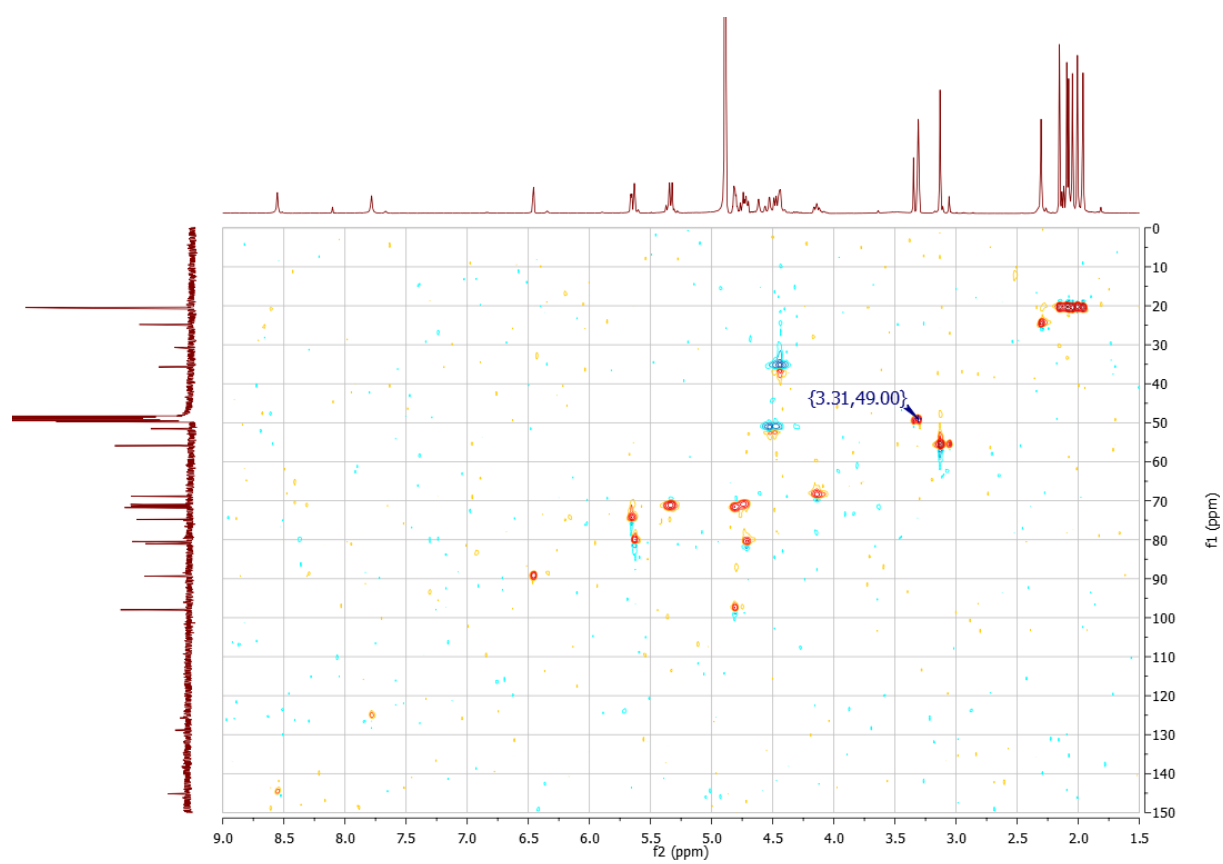


Figura 6.39 - Espectro de HSQC do composto **8**.

6.1.8.5 - HMBC

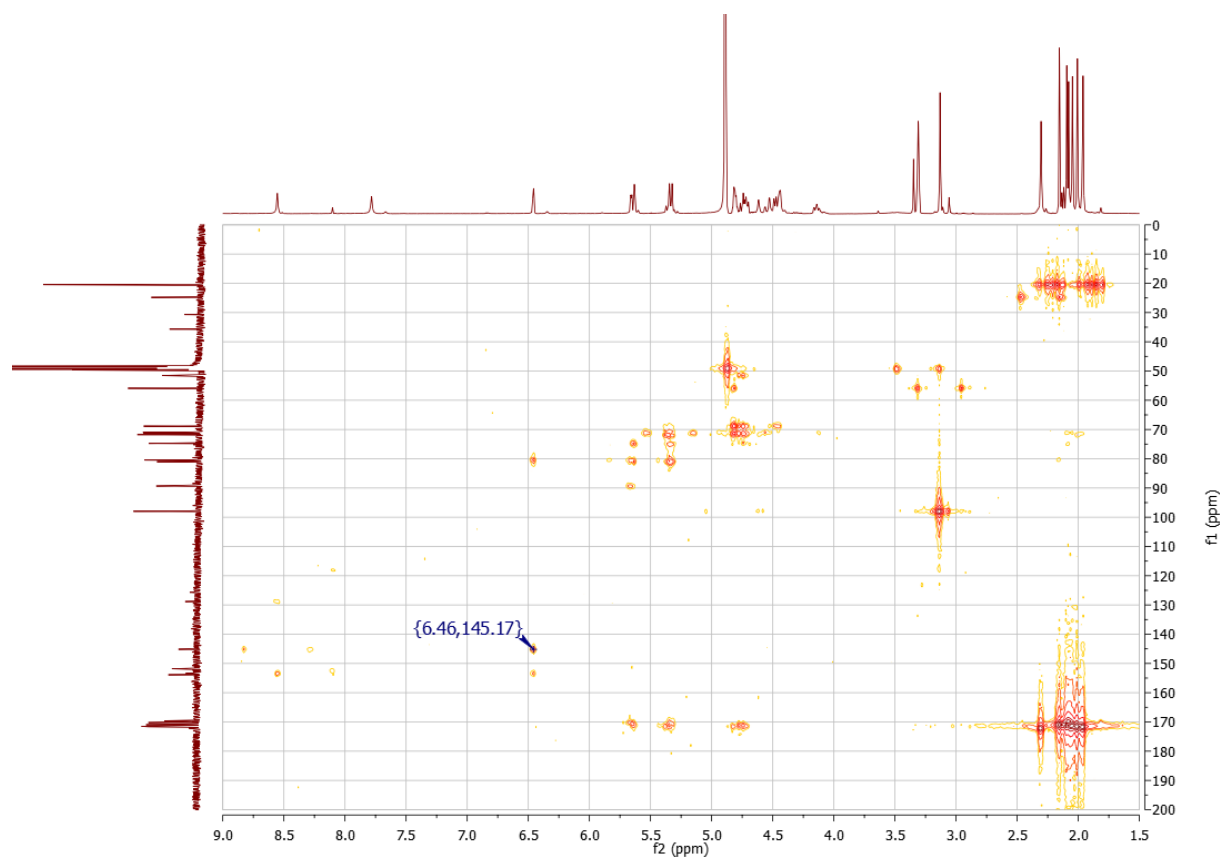


Figura 6.40 - Espetro de HMBC do composto **8**.

6.1.9 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **9**

6.1.9.1 - ^1H -RMN

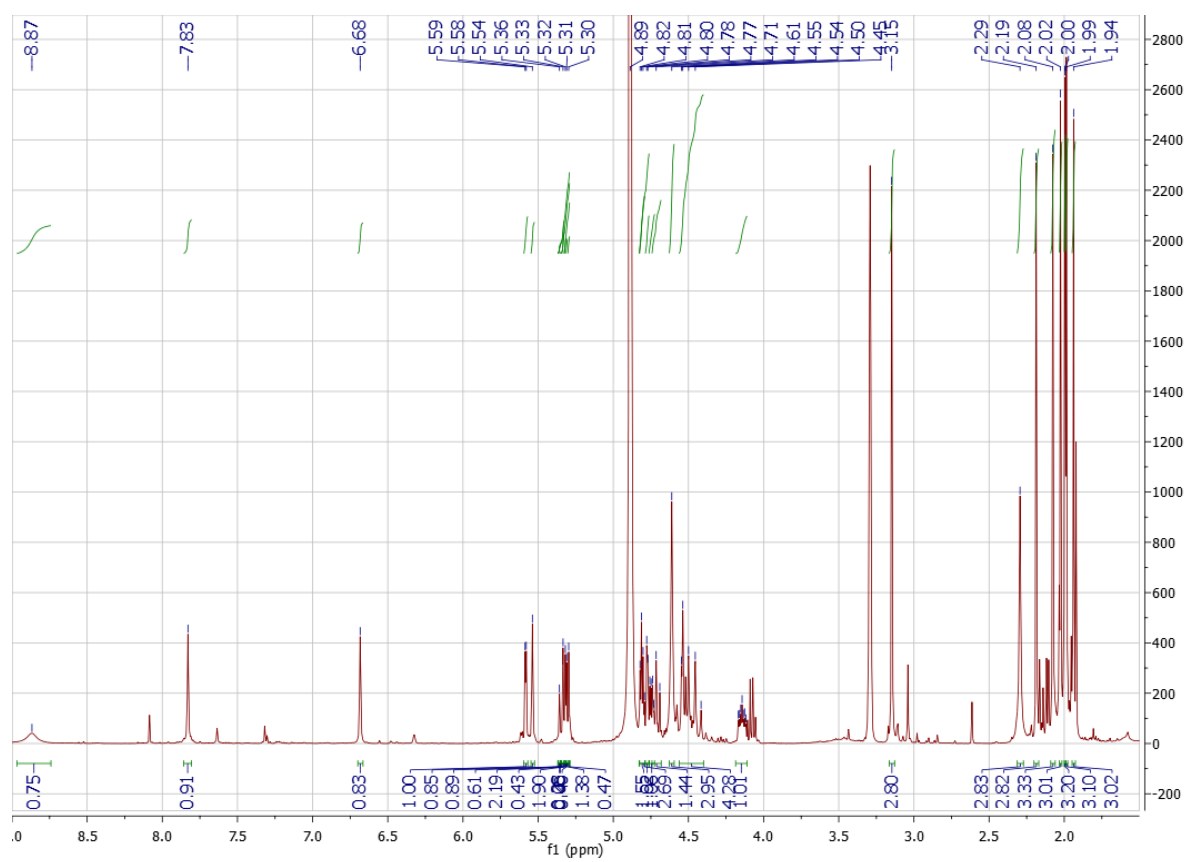
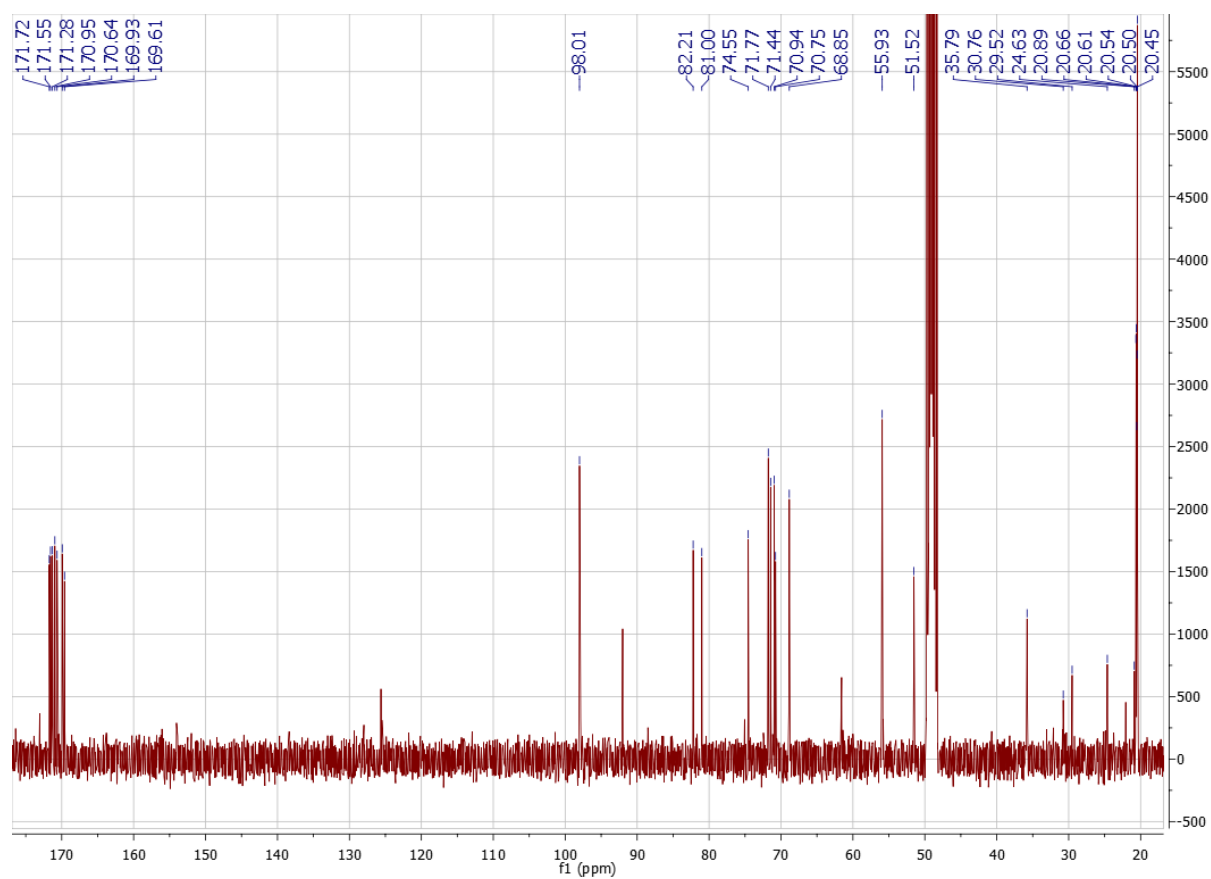


Figura 6.41 - Espetro de ^1H -RMN do composto **9**.

6.1.9.2 - ^{13}C -RMNFigura 6.42 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **9**.

6.1.9.3 - COSY

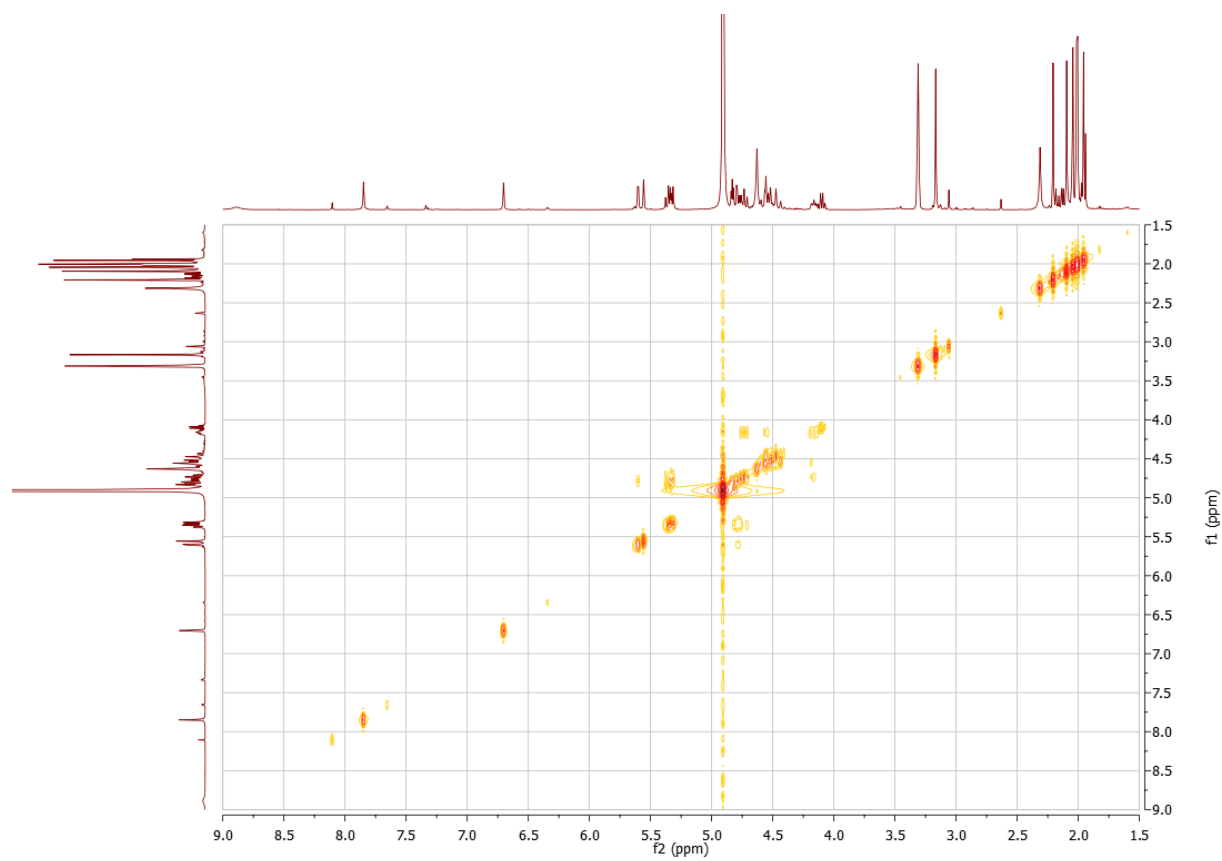


Figura 6.43 - Espetro de COSY do composto **9**.

6.1.9.4 - HSQC

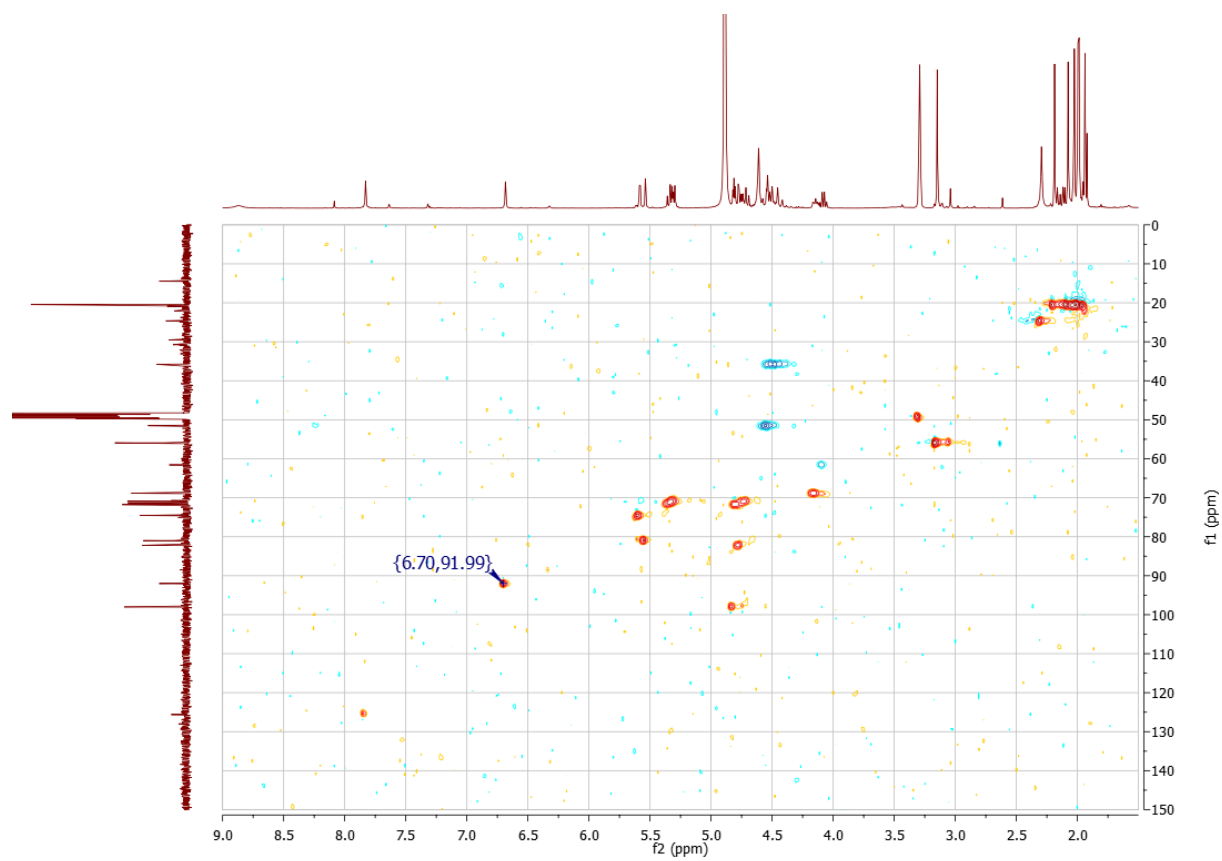


Figura 6.44 - Espectro de HSQC do composto 9.

6.1.9.5 - HMBC

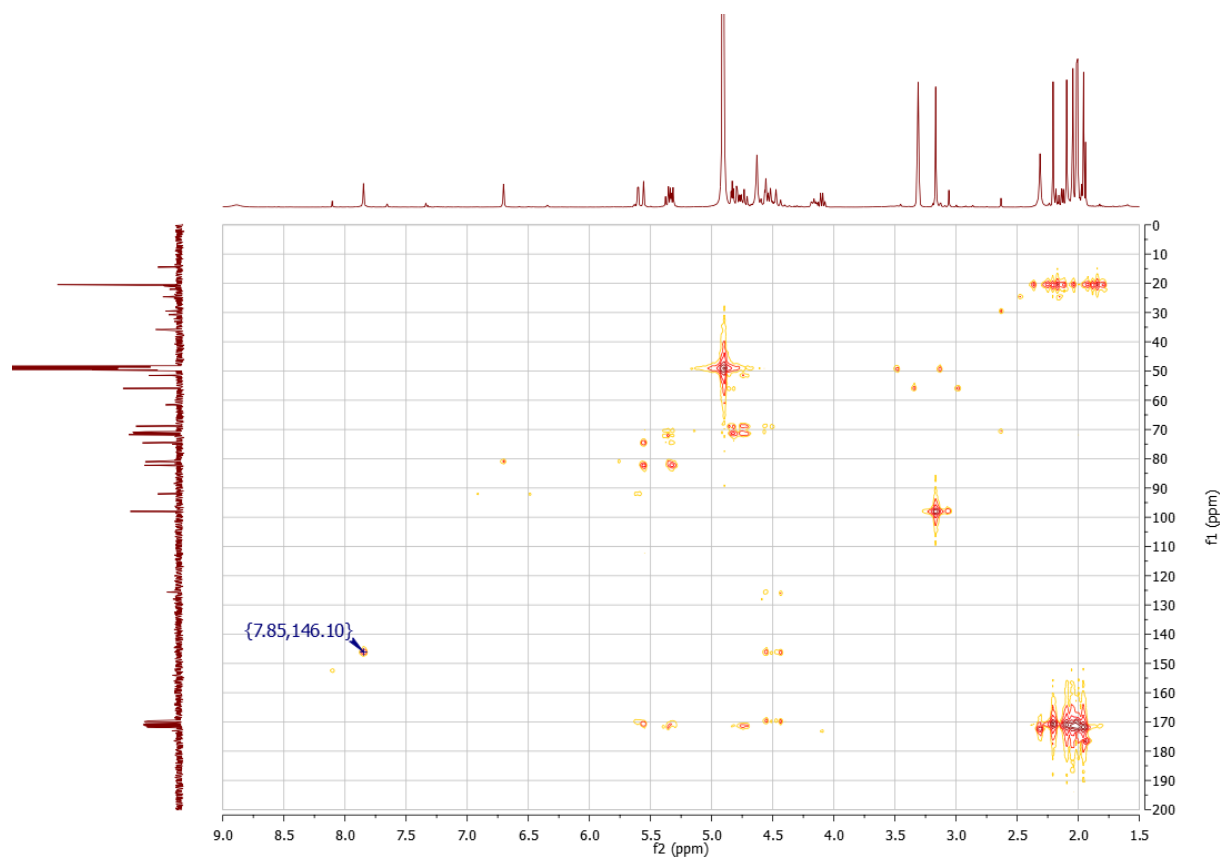
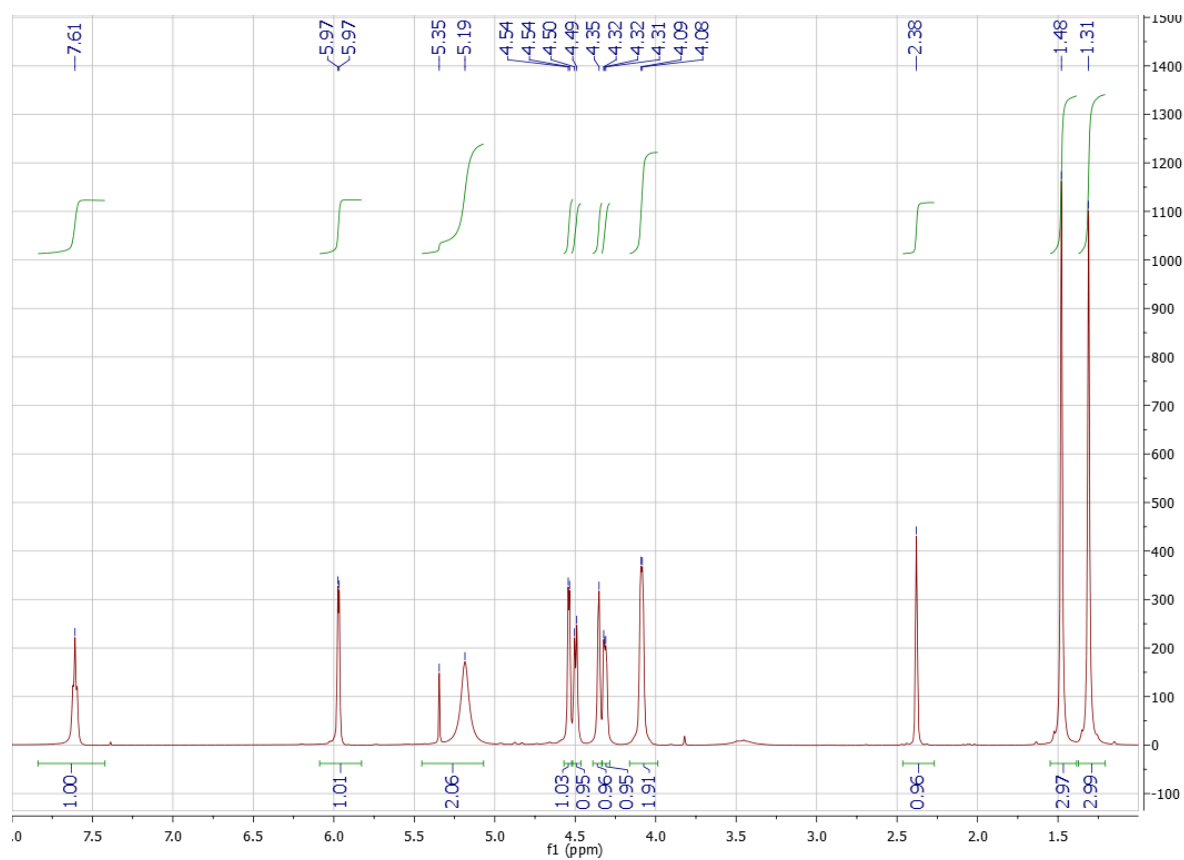


Figura 6.45 - Espectro de HMBC do composto **9**.

6.1.10 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **11**6.1.10.1 ^1H -RMNFigura 6.46 - Espetro de ^1H -RMN do composto **11**.

6.1.10.2 ^{13}C -RMN

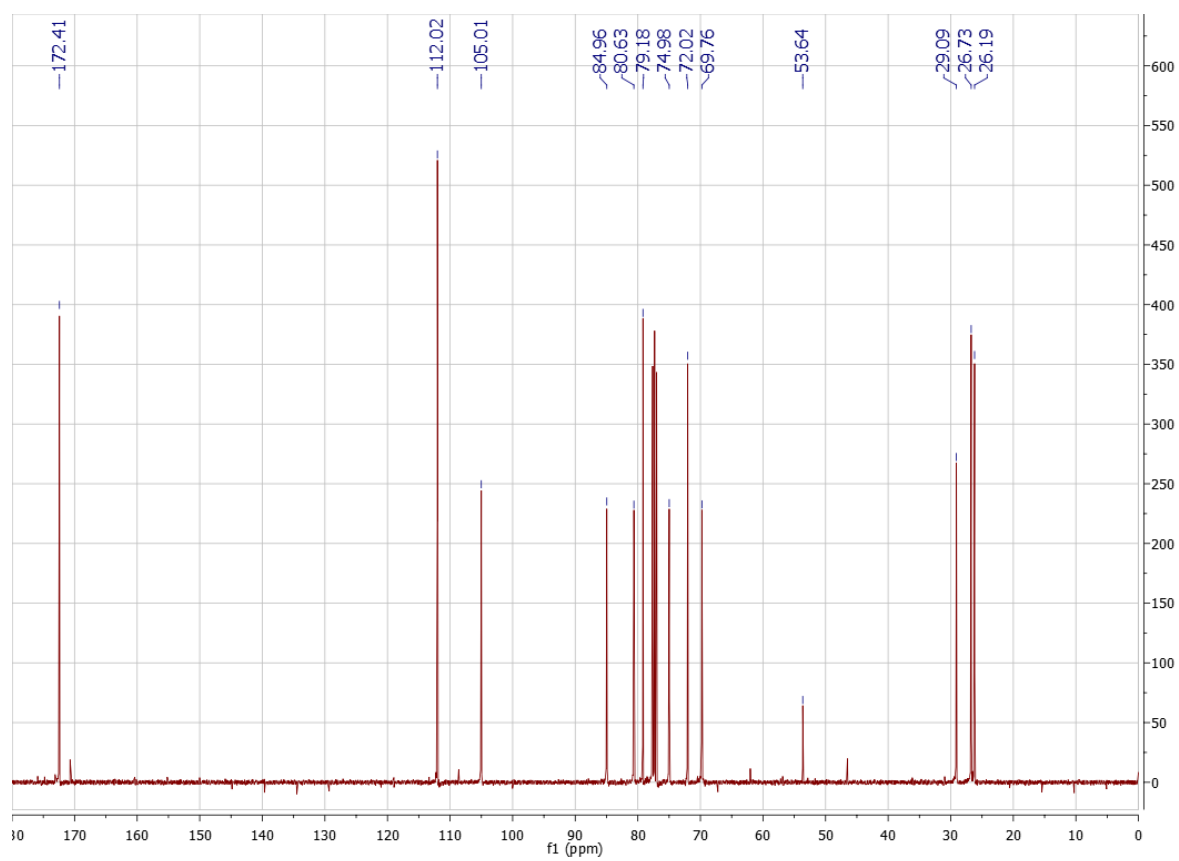


Figura 6.47 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto **11**.

6.1.10.3 COSY

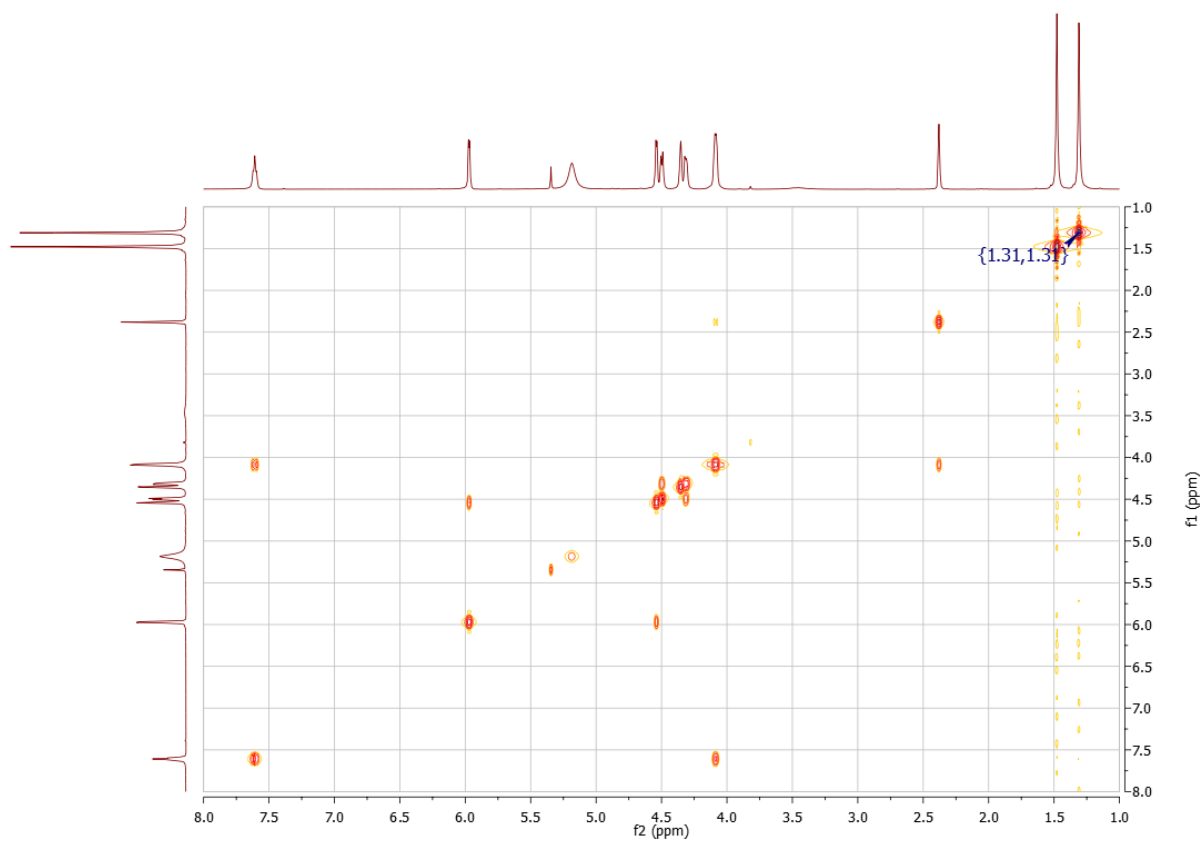


Figura 6.48 - Espetro de COSY do composto **11**.

6.1.10.4 HSQC

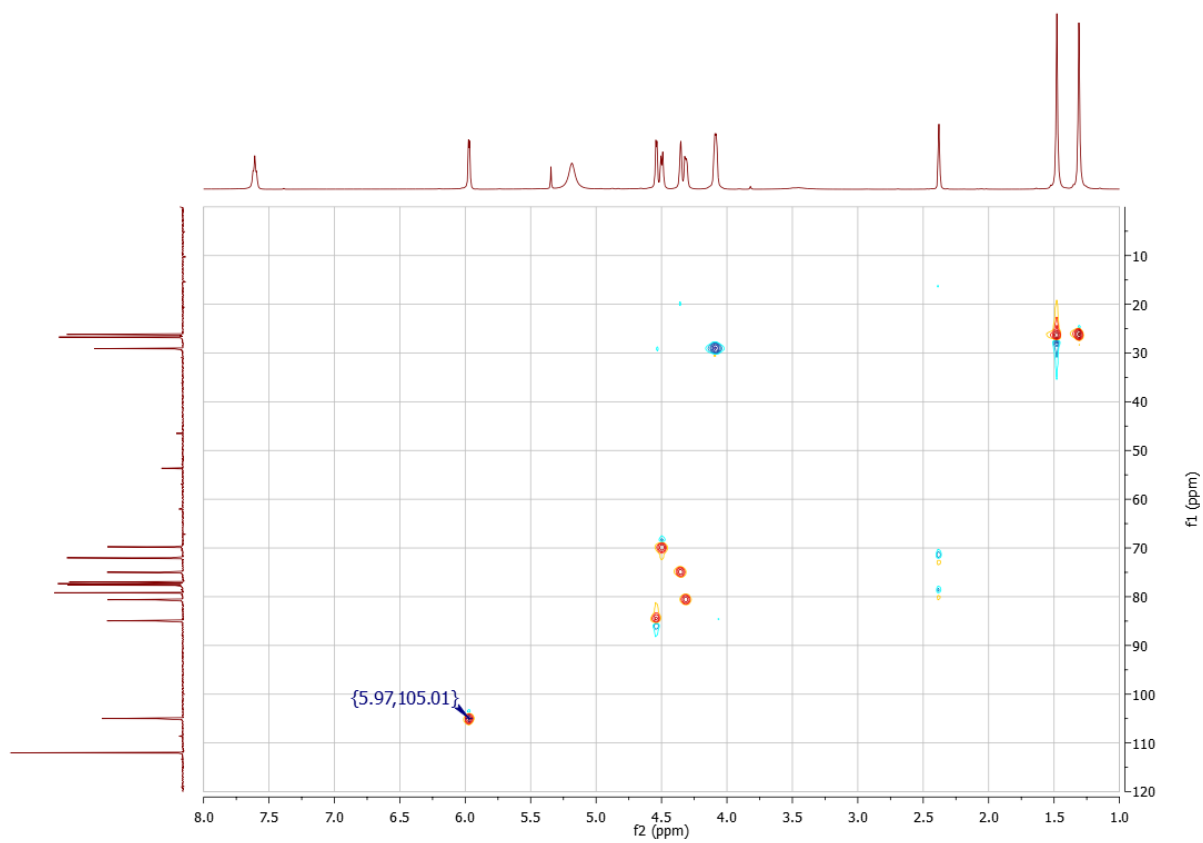


Figura 6.49 - Espectro de HSQC do composto **11**.

6.1.10.5 HMBC

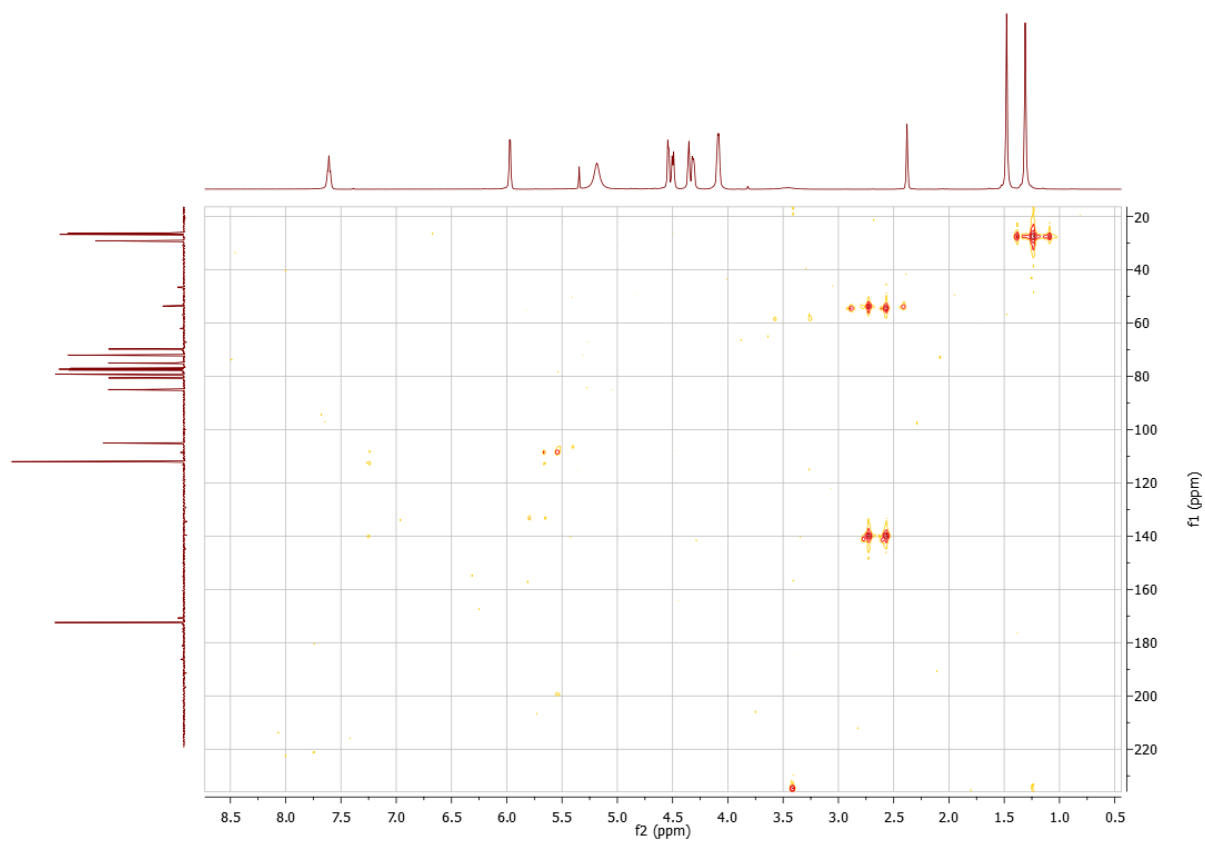


Figura 6.50 - Espetro de HMBC do composto **11**.

6.1.11 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **13**

6.1.11.1 ^1H -RMN

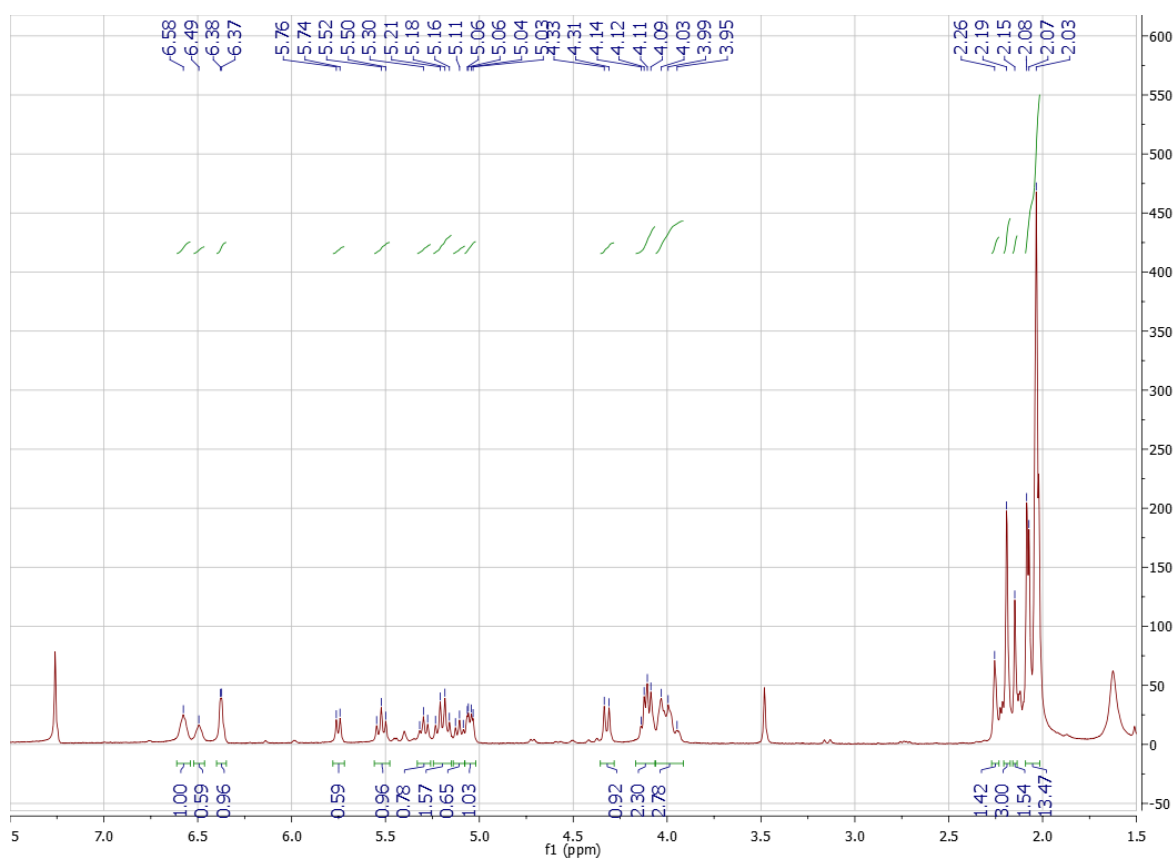
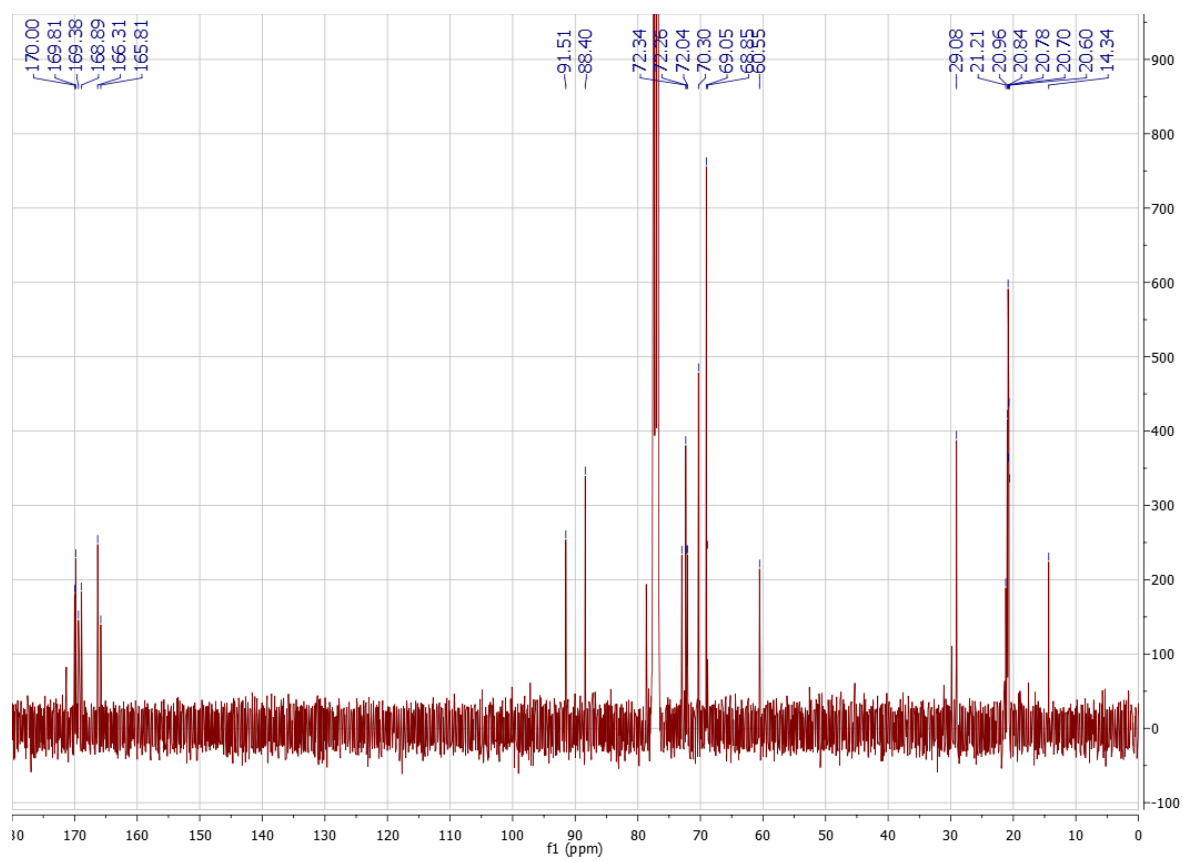


Figura 6.51 - Espetro de ^1H -RMN do composto **13**.

6.1.11.2 ^{13}C -RMNFigura 6.52 - Espectro de ^{13}C -RMN do composto **13**.

6.1.11.3 COSY

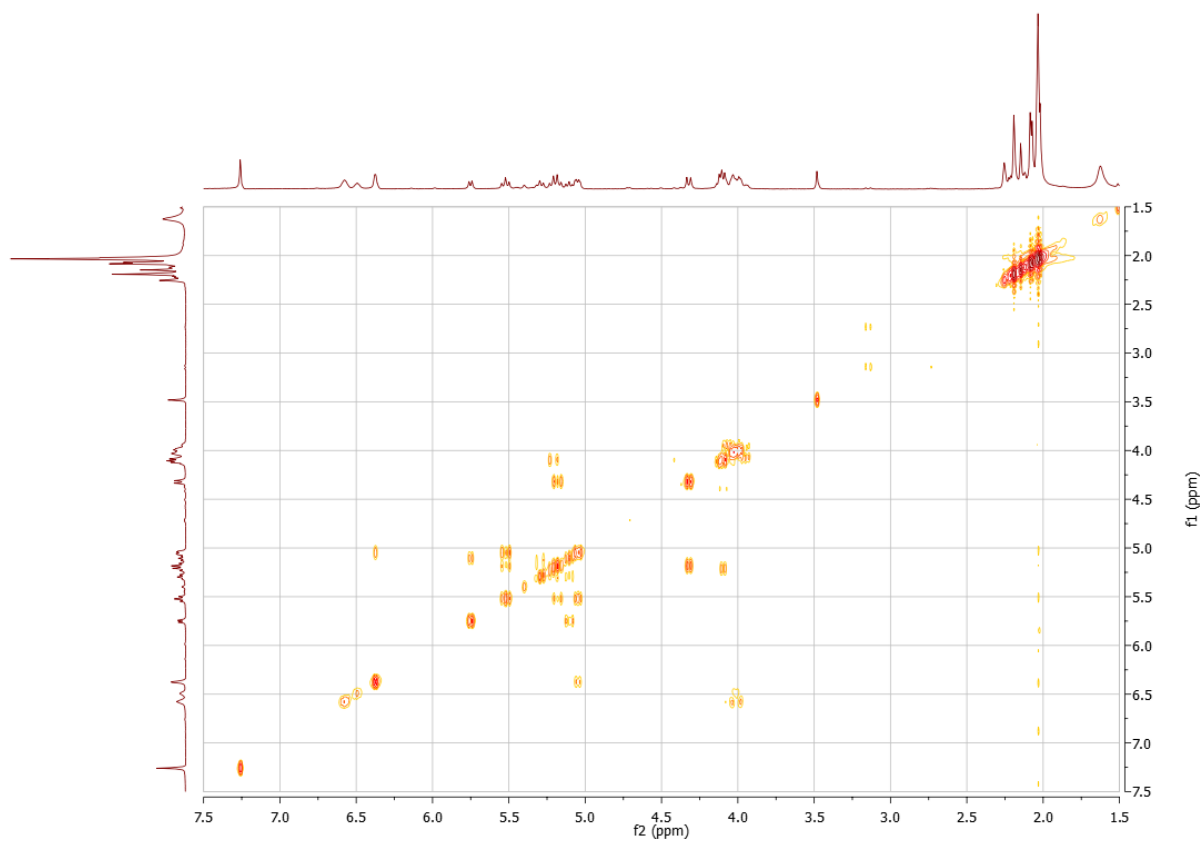


Figura 6.53 - Espetro de COSY do composto **13**.

6.1.11.4 HSQC

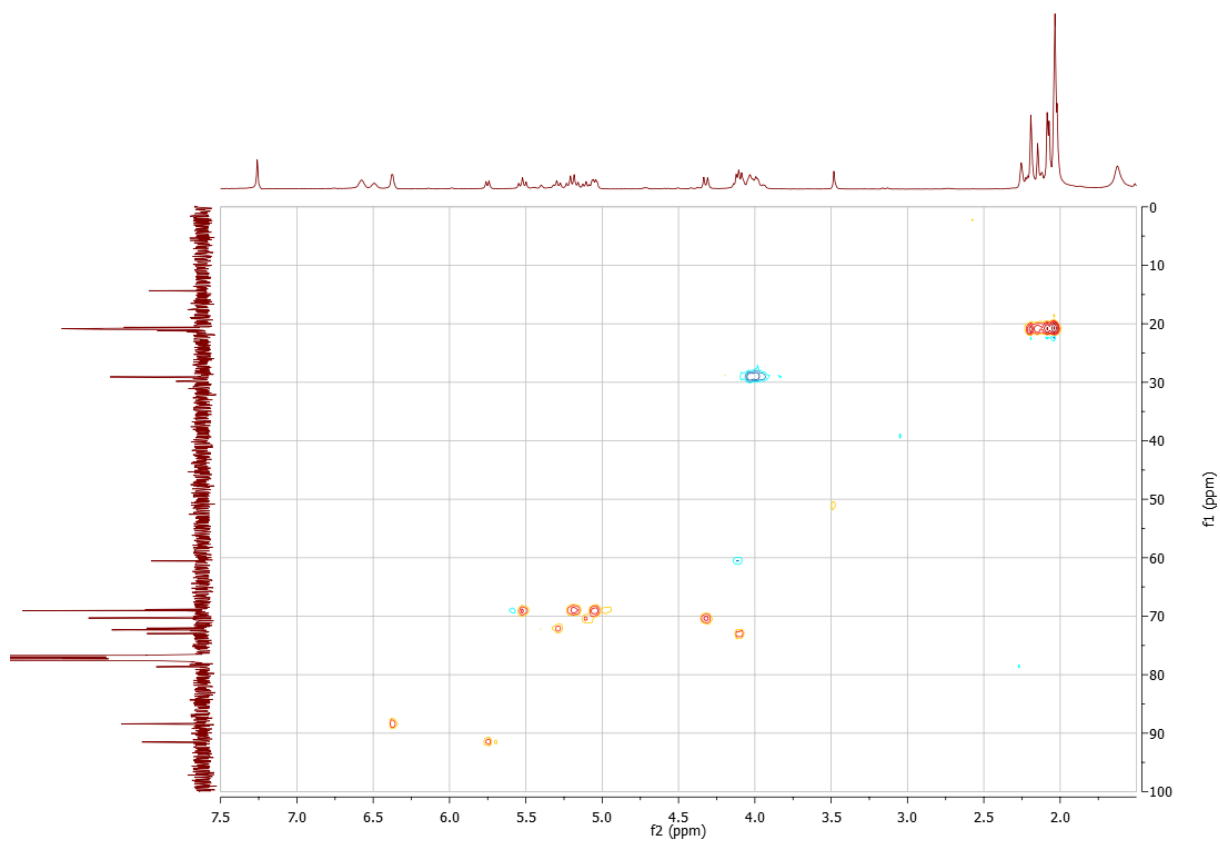


Figura 6.54 - Espectro de HSQC do composto **13**.

6.1.11.5 HMBC

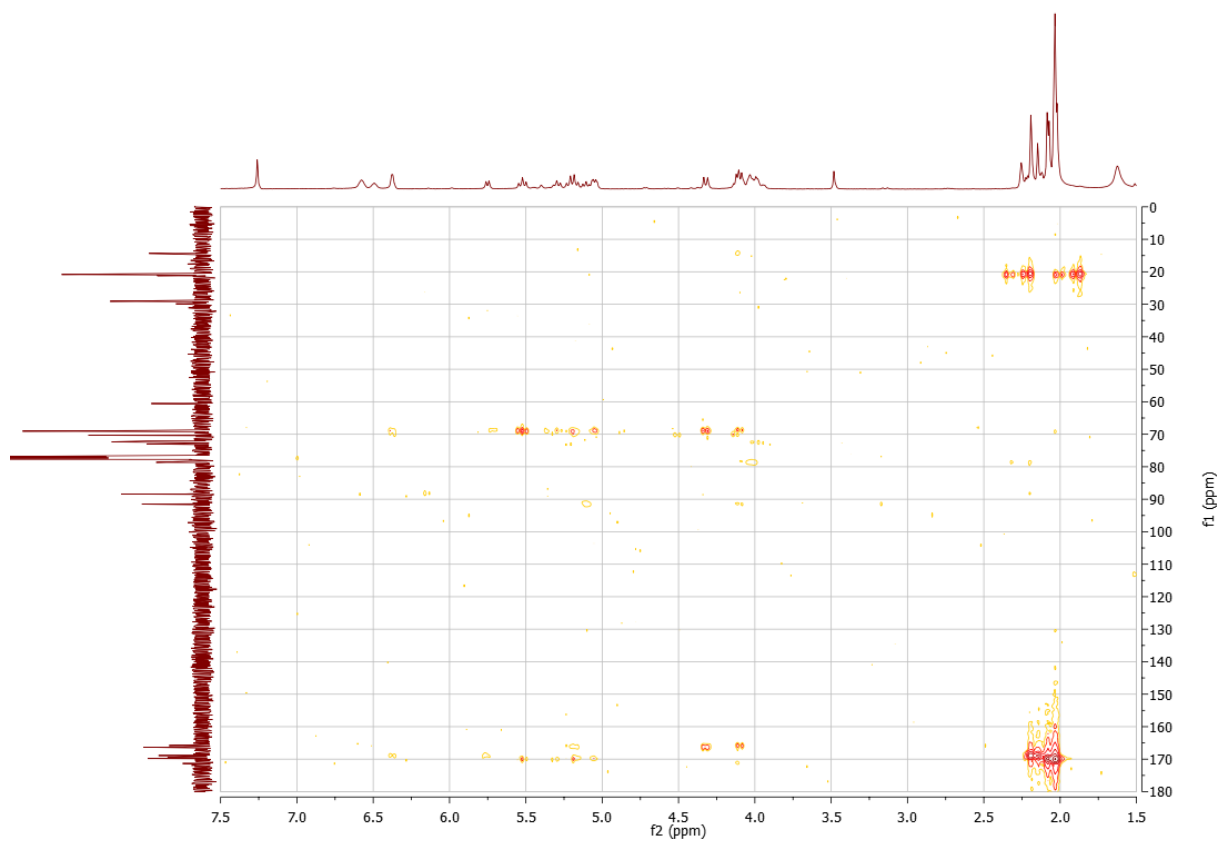


Figura 6.55 - Espectro de HMBC do composto **13**.

6.1.12 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **16**

6.1.12.1 ^1H -RMN

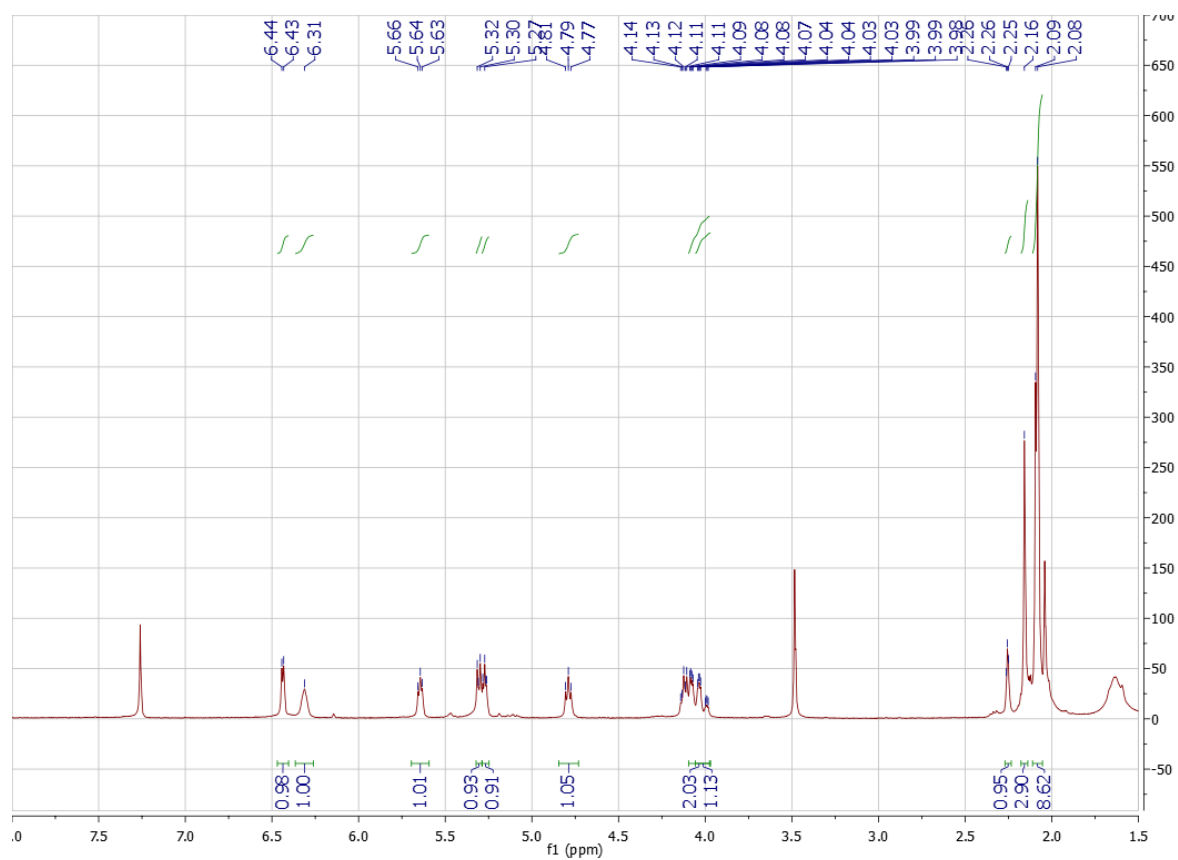
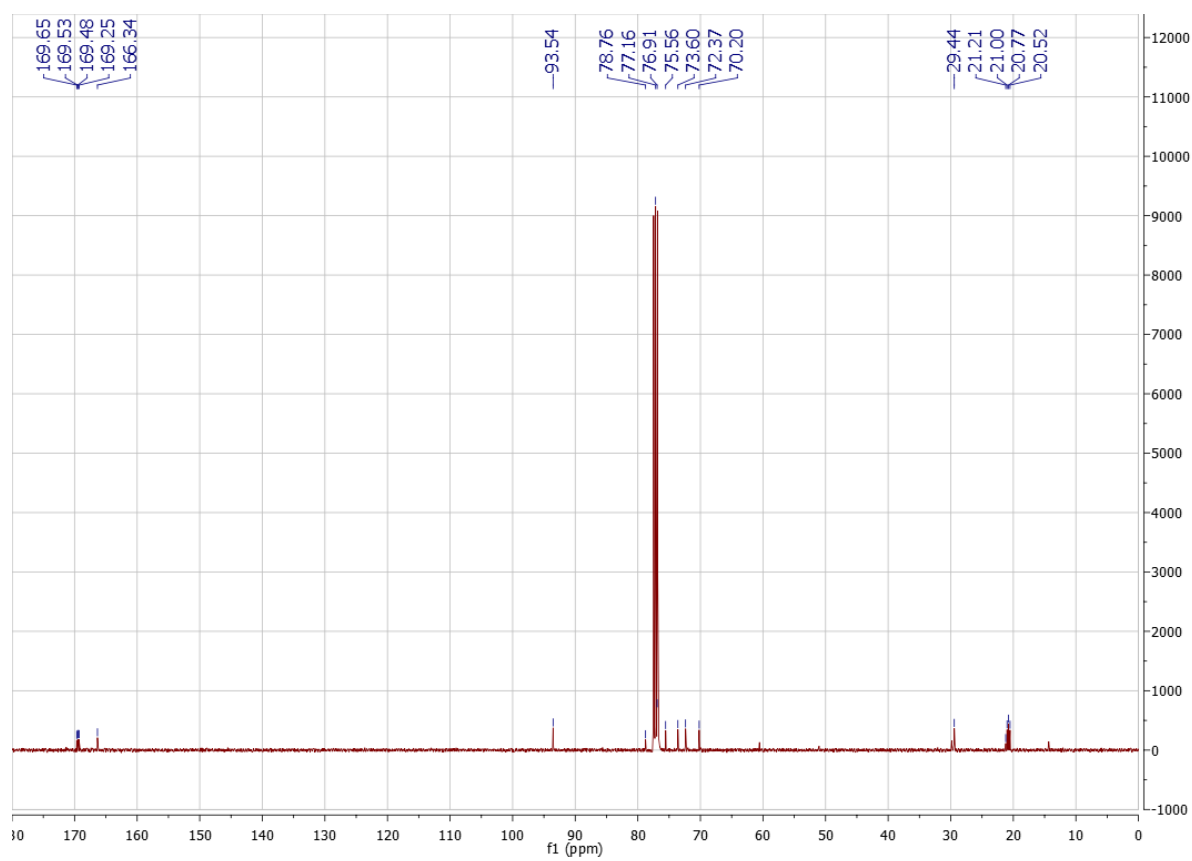


Figura 6.56 - Espetro de ^1H -RMN do composto **16**.

6.1.12.2 ^{13}C -RMNFigura 6.57 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto **16**.

6.1.12.3 COSY

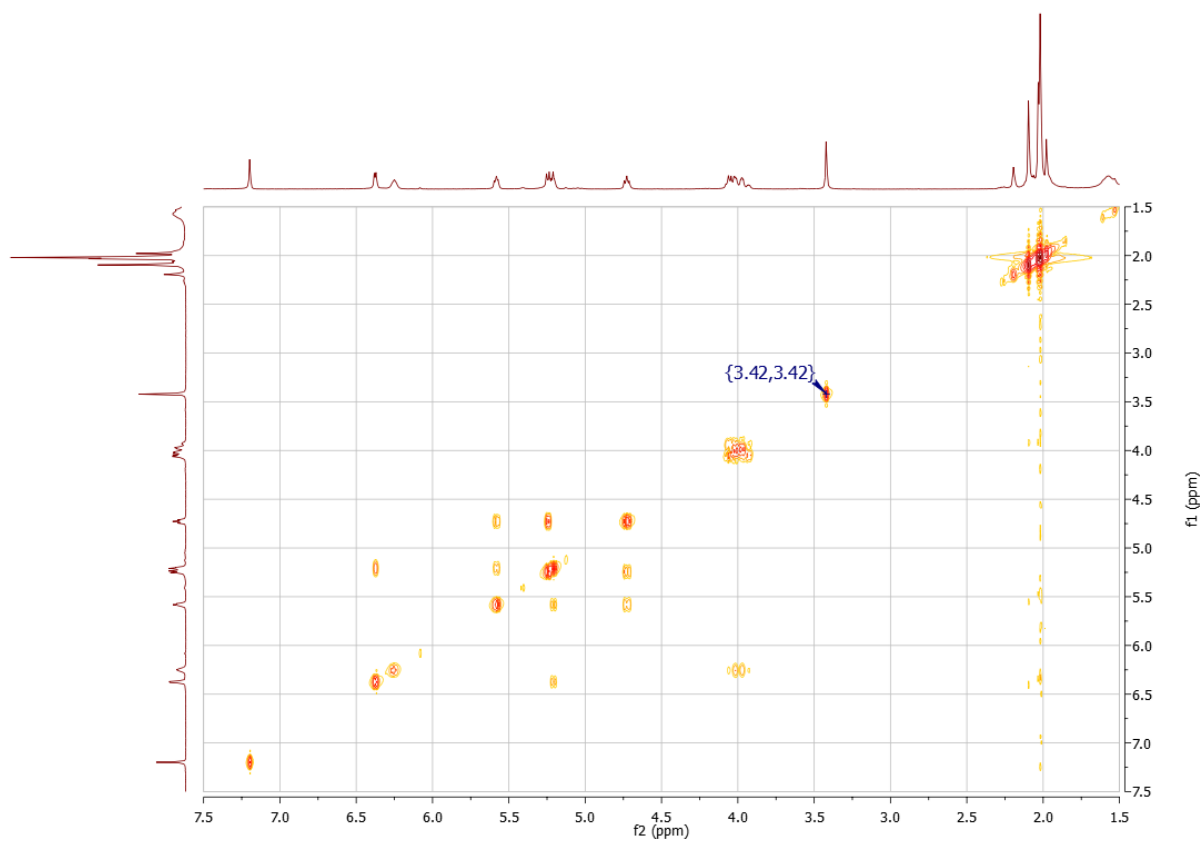


Figura 6.58 - Espetro de COSY do composto **16**.

6.1.12.4 HSQC

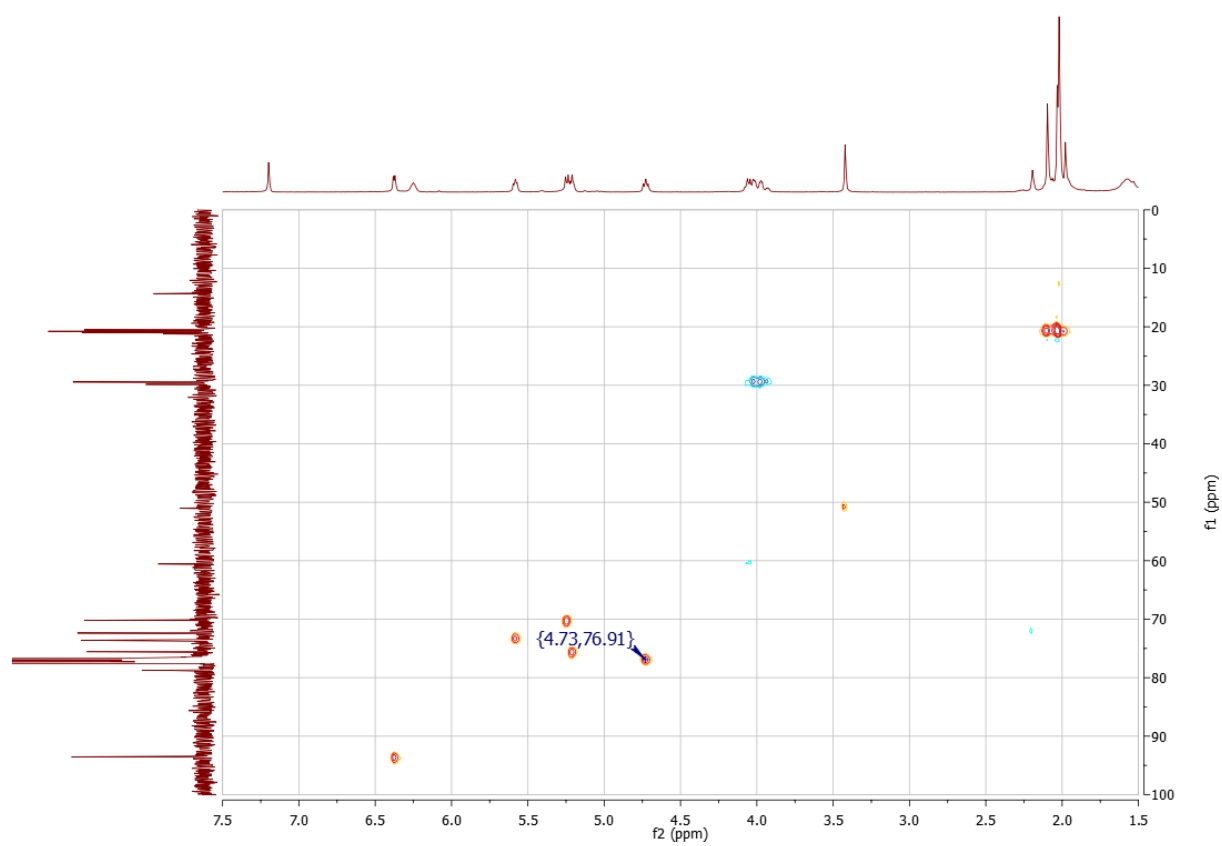
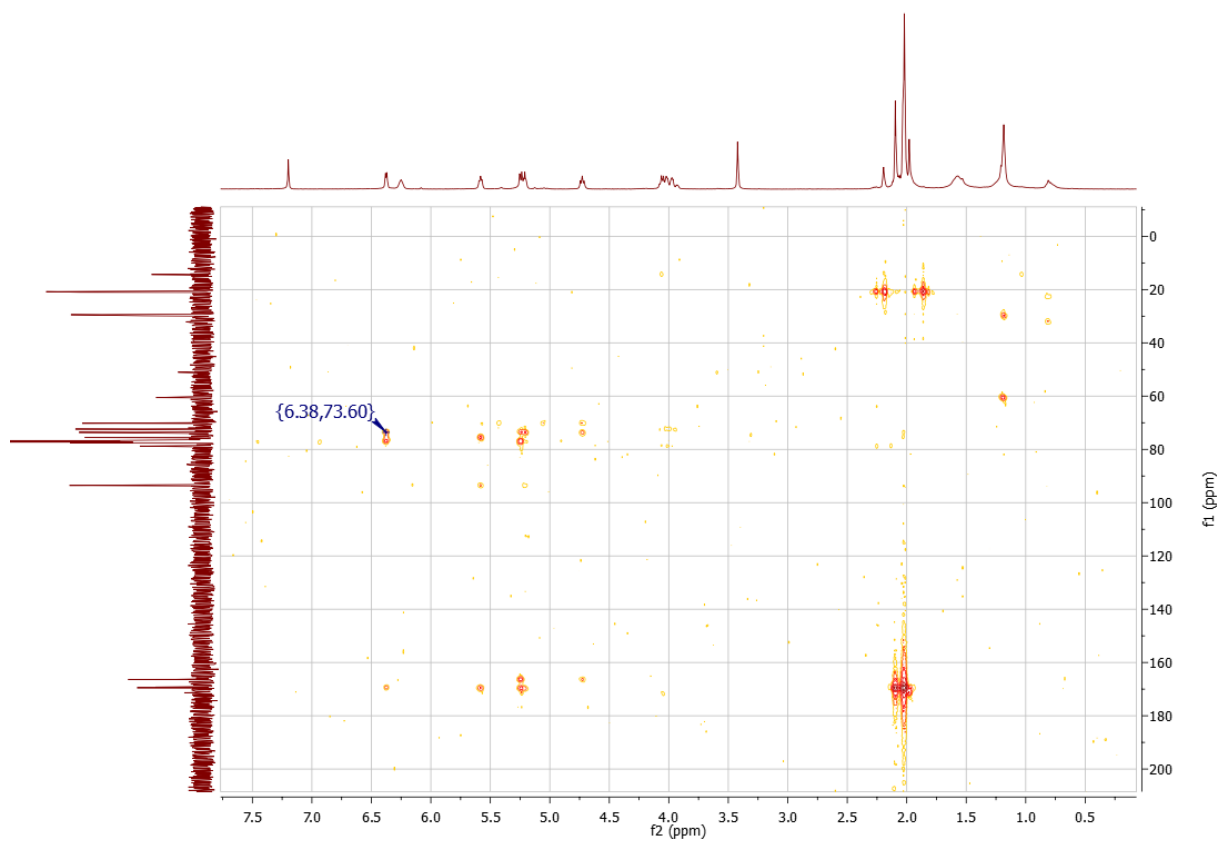
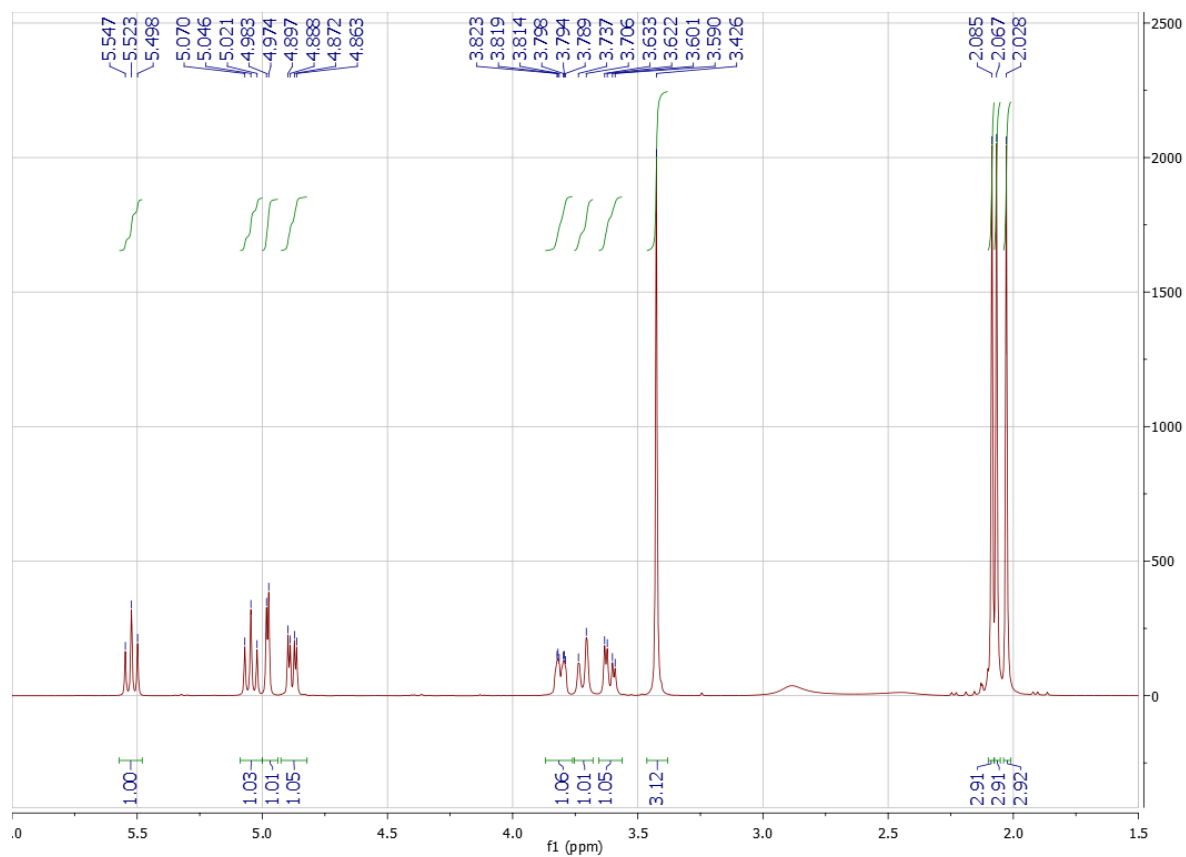


Figura 6.59 -- Espectro de HSQC do composto **16**.

6.1.12.5 HMBC

Figura 6.60 - Espetro de HMBC do composto **16**.

6.1.13 Espetros de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HSQC e HMBC do Composto **20**6.1.13.1 ^1H -RMNFigura 6.61 - Espetro de ^1H -RMN do composto **20**.

6.1.13.2 ^{13}C RMN

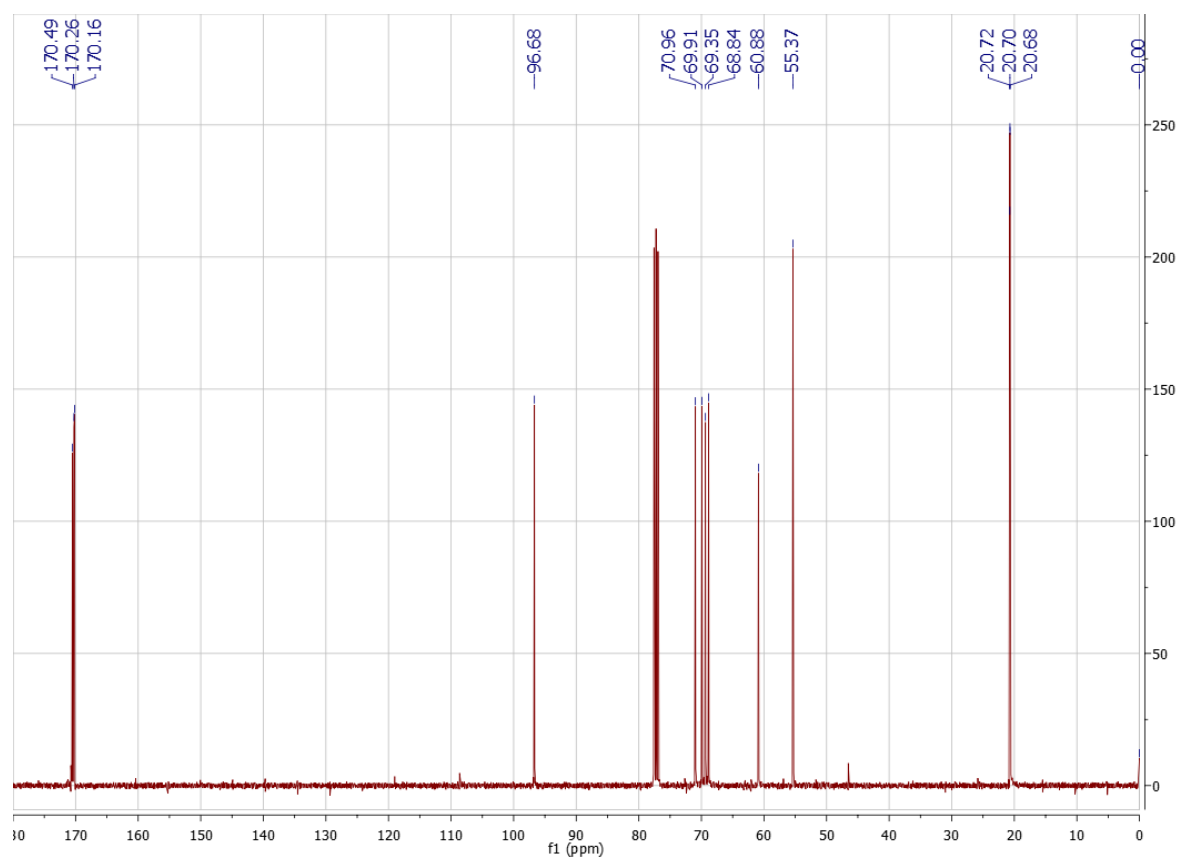


Figura 6.62 - Espetro de ^{13}C -RMN do composto **20**.

6.1.13.3 COSY

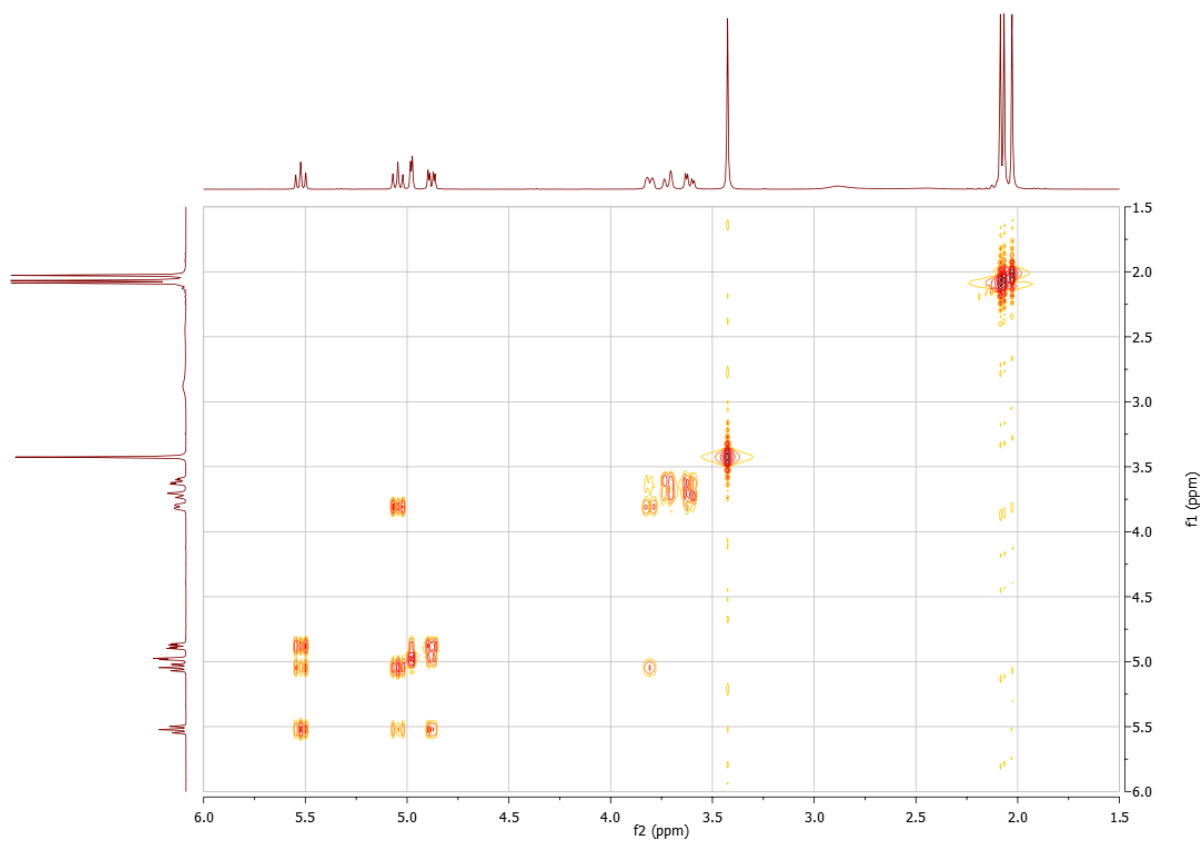


Figura 6.63 - Espetro de COSY do composto **20**.

6.1.13.4 HSQC

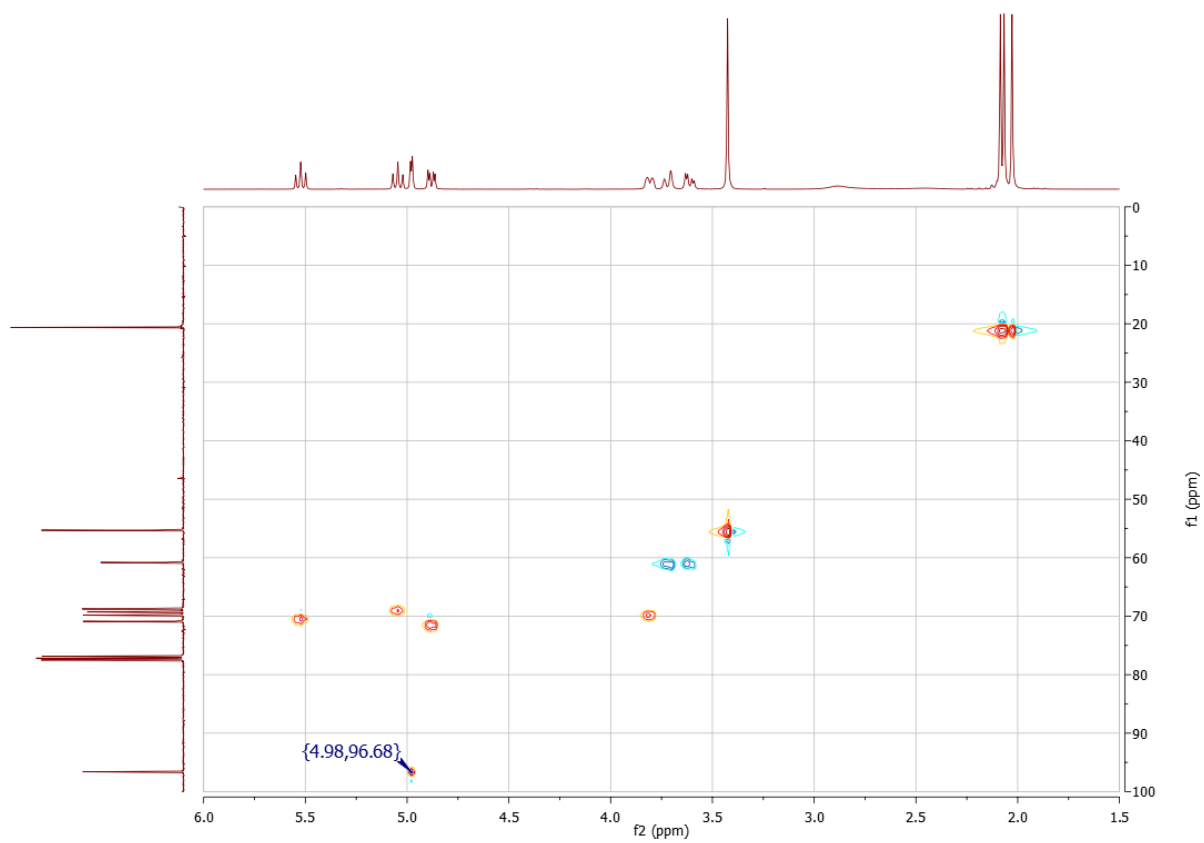


Figura 6.64 - Espetro de HSQC do composto **20**.

6.1.13.5 HMBC

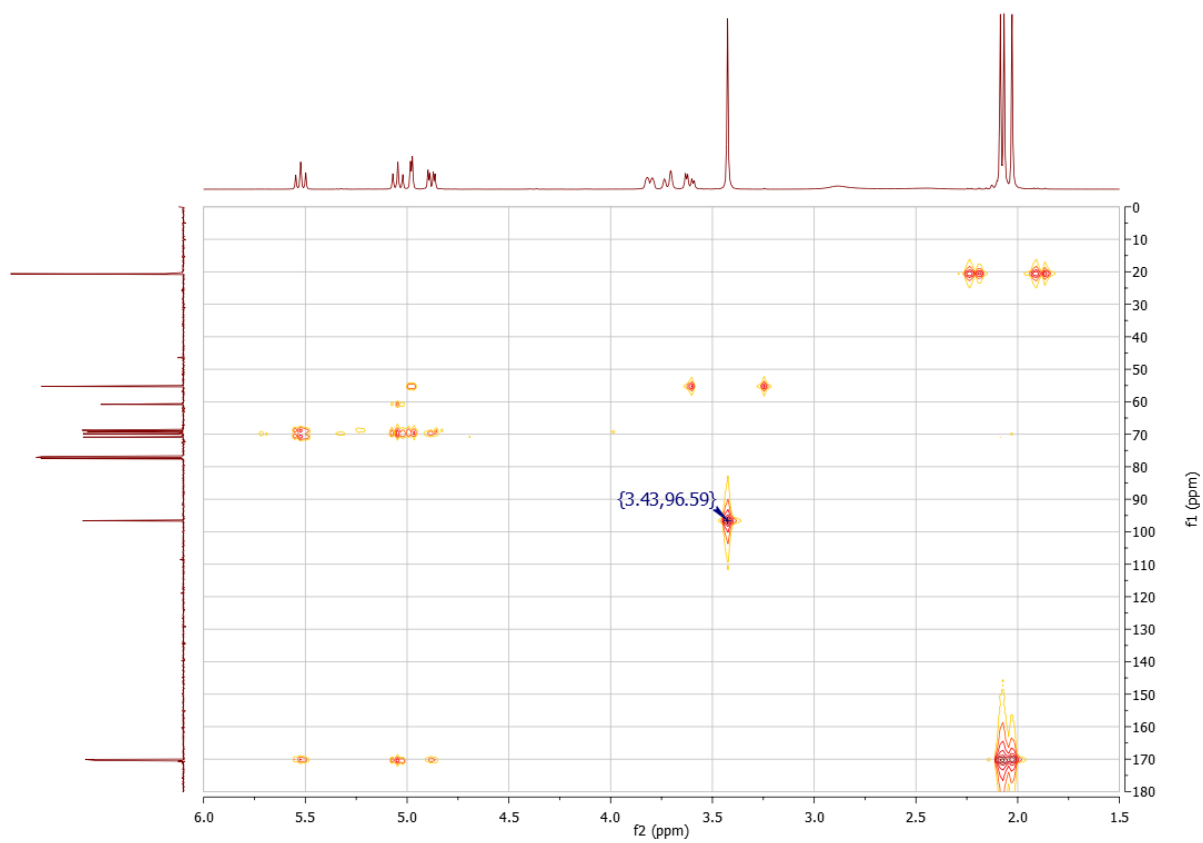


Figura 6.65 - Espectro de HMBC do composto **20**.